

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 7 :

G01N 30/48, 30/28

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/50887

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

31. August 2000 (31.08.00)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP00/01393

(22) Internationales Anmeldedatum: 21. Februar 2000 (21.02.00)

(30) Prioritätsdaten:

199 07 296.5

22. Februar 1999 (22.02.99)

DE

100 04 673.8

3. Februar 2000 (03.02.00)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, D-22525 Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MUSCATE-MAGNUSSEN, Angelika [DE/DE]; Prah! Strasse 1-3, D-22765 Hamburg (DE).

(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Von Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).

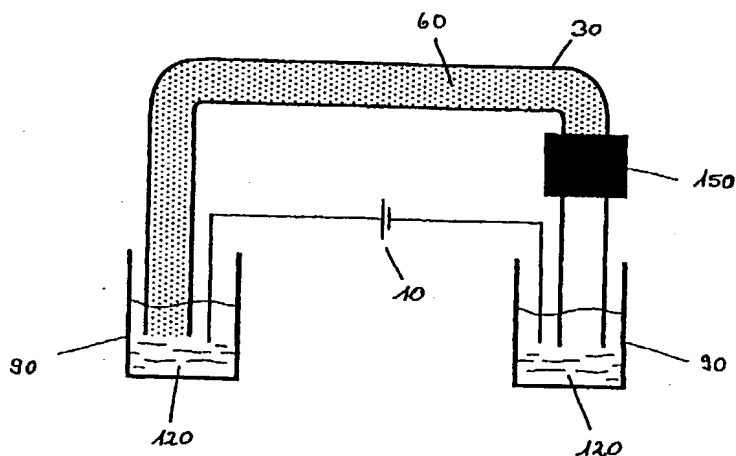
(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: UTILIZATION OF SUPPORTING MATERIAL IN CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON TRÄGERMATERIAL IN DER KAPILLAR-ELEKTROCHROMATOGRAPHIE



(57) Abstract

The invention relates to the utilization of supporting material for capillary electrochromatography (CEC) which is characterized in that the supporting material is porous and the surface is composed of an outer surface and of a porous surface, whereby the outer surface has areas of varying derivatization and/or functionality which can be differentiated from the porous surface.

(57) Zusammenfassung

Verwendung von Trägermaterial für die Kapillar-Elektrochromatographie (CEC), dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial porös ausgestaltet ist und die Oberfläche sich aus einer äußeren und einer Porenoberfläche zusammensetzt, wobei die äußere Oberfläche von der Porenoberfläche unterscheidbare Bereiche unterschiedlicher Derivatisierung und/oder Funktionalität aufweist.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verwendung von Trägermaterial in der Kapillar- Elektrochromatographie

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Trägermaterialien in der Kapillar-Elektrochromatographie (CEC).

Im allgemeinen sind Analysenmethoden im günstigsten Fall selektiv; nur wenige, wenn überhaupt, sind jedoch wirklich spezifisch. Folglich ist im Rahmen einer Analyse die Abtrennung des Analyten von störenden Begleitsubstanzen unumgänglich.

In chromatographischen Trennungen wird die Probe in einer mobilen Phase gelöst, bei der es sich z.B. um ein Gas, eine Flüssigkeit oder ein überkritisches Fluid handeln kann. Die mobile Phase wird durch eine mit ihr nicht mischbare stationäre Phase bewegt, die sich z.B. in einer Säule befindet oder an einer festen Oberfläche fixiert ist. Die beiden Phasen werden so gewählt, dass sich die Probenkomponenten in verschiedenem Maße zwischen der mobilen und stationären Phase verteilen. Die Komponenten, die von der stationären Phase in starkem Maße zurückgehalten werden, bewegen sich nur langsam mit der mobilen Phase weiter. Demgegenüber bewegen sich die Komponenten, die nur schwach von der stationären Phase zurückgehalten werden, schnell. Aufgrund dieser Unterschiede trennen sich die Probenkomponenten in diskrete Banden auf.

Ein Chromatographiekonzept, das die Vorteile der Kapillarflüssigkeitsschromatographie (z.B. HPLC) und der Kapillarelektrophorese (CE) verbindet, ist die sogenannte Kapillar-Elektrochromatographie (CEC). Im wesentlichen kann CEC als Hybrid aus HPLC und CE angesehen werden (Colon *et al.*, Analytical Chemistry News & Features 1995; August 1,

461A-467A). Wie in der HPLC werden die Komponenten einer Probe durch unterschiedliche Verteilung zwischen einer stationären und einer mobilen Phase aufgetrennt. Zusätzlich wird aber, wie in der CE, durch Anlegen einer elektrischen Spannung ein elektroosmotischer Fluss erzeugt. Die Trennungen können isokratisch oder mit einem Gradienten durchgeführt werden. Die Säulen sind bevorzugt mit Kieselgelpartikeln gefüllt, die typischerweise Partikeldurchmesser im Bereich von 1 bis 5 μm haben.

Der Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit der Trennung von anionischen, kationischen und neutralen Molekülen. Allerdings besteht ein großes Problem in der Analyse komplexer, insbesondere biologischer Proben. Diese, wie z.B. hämolysiertes Blut, Plasma, Serum, Milch, Speichel, Rückenmarksflüssigkeit, Fermenterbrühe, Urin, Überstände von Zellkultur-, Lebensmittel- und Gewebekomogenaten oder Naturstoffextrakte, enthalten neben dem Analyten einen großen Anteil an Matrixkomponenten, wie Proteine und Salze.

Proteine und andere Makromoleküle werden z.B. durch hohe Anteile von organischen Lösungsmitteln in der mobilen Phase ausgefällt oder durch Restsilanolgruppen an der Oberfläche eines chromatographischen Trägers unspezifisch, irreversibel gebunden oder denaturiert (J. R. Verart *et al.*, J. Chromatography A 1999; 471-475). Die Proteine und andere Makromoleküle blockieren bei Verwendung einer porösen stationären Phase den Zugang zu den Poren und verringern damit die Anzahl der chromatographischen Adsorptionszentren. Durch den damit verbundenen verringerten Stoffaustausch zwischen stationärer und mobiler Phase führen diese Vorgänge zu einem Kapazitäts- und Selektivitätsverlust der Säule. Nichtspezifische Adsorption führt darüber hinaus zu Schwankungen des elektroosmotischen Flusses und zu nicht reproduzierbaren Re-

tentionszeiten der Analyten. In allen Fällen wird die CEC-Säule schwer geschädigt oder unbrauchbar gemacht. Daher ist es notwendig, diese Matrixkomponenten vor der CEC-Analyse aus der Probe zu entfernen.

Diese Problematik wiegt umso schwerer, da sie Bestimmungen betrifft, die in großer Anzahl durchgeführt werden: z.B. Metabolismusstudien, Therapiekontrolle, Bestimmung von körpereigenen Substanzen, Qualitätskontrolle von Lebensmitteln oder auch das Hochdurchsatzscreening nach potenziellen pharmakologischen Wirkstoffen, insbesondere unter Verwendung von Naturstoffextrakten.

Gängige Probenaufbereitungsverfahren sind neben Verfahren der Dialyse, Ultrafiltration, Proteinpräzipitation, Flüssig/Flüssig-Extraktion insbesondere Verfahren der Festphasenextraktion z.B. Kartuschenverfahren oder die Verwendung von Vorsäulen, die vorzugsweise mit Kieselgelpartikeln gefüllt sind, wobei die Elution des Analyten bevorzugt durch Flüssigdesorption (HPLC) erfolgt. Die Verwendung von Vorsäulen zur Abtrennung von Analyten aus protein- bzw. matrixhaltigen Proben in der HPLC wird beispielsweise von Rudolphi und Boos (LC-GC 15 (9) 814-823, 1997) beschrieben.

Allerdings sind die notwendigen Probenvorbehandlungsschritte oft zeit-, kosten- und arbeitsintensiv und führen durch den notwendigen Transfer des Analyten auf eine Trennsäule zu einer Volumenvergrößerung der Probe, die zu einem Verlust an Selektivität und Empfindlichkeit des Trennverfahrens führt. Darüber hinaus sind zur Durchführung dieser Probenvorbehandlungsschritte Probenvolumina von mindestens 10 µl erforderlich, was insbesondere den Einsatz zur Probenaufbereitung in Hochdurchsatzverfahren, in denen nur nl bis wenige µl Probe zur Verfügung stehen, unmöglich macht.

Pinkerton et al. (US-Patent 4,544,485) beanspruchen ein Trägermaterial für die Flüssigkeitschromatographie auf Silika- oder Glas-Basis, das eine Abtrennung von Proteinen bzw. Makromolekülen aus einer Probe ermöglicht. Das sogenannte Internal Surface Reverse Phase (ISRP)-Material zeichnet sich durch eine hydrophile äußere Oberfläche und eine hydrophobe innere bzw. Porenoberfläche aus. In einer Modifikation ist beispielsweise an der äußeren Partikeloberfläche Glycin gebunden. Die Porenoberfläche zeichnet sich durch über Glycerolpropyl gebundene Polypeptide insbesondere Tripeptide aus. Diese führen zu einer begrenzten Zugängigkeit der Poren. Kleinere Zielmoleküle (Analyten) erhalten Zugang zu den Poren, während die großen Matrixmoleküle ausgeschlossen bleiben.

Boos et al. (LC-GC 1997,15, 602-611; LC-GC 1996,14, 554-560) beschreiben ein Trägermaterial auf Alkyl-Diol-Silika-Basis (ADS), das quantitative Abtrennung von Proteinen und anderen makromolekularen Bestandteilen gewährleistet. Es zeichnet sich durch eine für Biomoleküle inerte Oberfläche aus und ist in den Poren mit Alkylgruppen belegt. Die Porengröße ermöglicht kleinen Zielmolekülen (Analyten) Zugang, während die großen Matrixmoleküle ausgeschlossen bleiben. Dieses Material wurde speziell für HPLC-Analysen entwickelt.

L. J. Glunz et al. (J. of Liquid Chromatography 1992, 15, 1361-1379) entwickelten ebenfalls ein sogenanntes Restricted Access Material auf Silika-Basis für die HPLC, dessen Funktionsweise auf einer semipermeablen Membran (SPS) an der Partikeloberfläche beruht. Durch Oberflächenbelegung des Trägermaterials mit Polyethylenglycol oder Polyoxyethylen entsteht ein Netzwerk, das nur kleinen Analyten einen Zugang zu den Poren ermöglicht. Makromolekülen ist damit der Zugang zu den Poren nicht möglich. Die Porenoberfläche ist mit hydrophoben

Gruppen insbesondere Phenylgruppen, C18, C8 und Nitril belegt.

Weitere speziell für die HPLC entwickelte Restricted Access Trägermaterialien auf der Basis poröser Materialien, dessen äußere Oberfläche eine andere Derivatisierung als die Porenoberfläche aufweist, sind insbesondere ChromSper 5 Biomatrix (Chrompack), Hisep (Supelco) und Capcell Pak MF (Shiseido).

Die Verfahren der Kapillar-Elektrochromatographie und der HPLC unterscheiden sich insbesondere durch die in der CEC auftretenden elektroosmotischen Kräfte erheblich voneinander. Für die HPLC geeignete Materialien und Bedingungen sind somit nicht einfach auf das Verfahren der CEC zu übertragen (Colon et al., Analytical Chemistry & Features 1997; August 1).

Daher war es um so überraschender, dass die Verwendung von Trägermaterial, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es porös ausgestaltet ist und dessen Oberfläche sich aus einer äußeren und einer Porenoberfläche zusammensetzt, wobei die äußere Oberfläche von der Porenoberfläche unterscheidbare Bereiche unterschiedlicher Derivatisierung und/oder Funktionalität aufweist, in der Kapillar-Elektrochromatographie eine im wesentlichen quantitative Abtrennung des Analyten von anderen Probenkomponenten, insbesondere Proteinen und anderen makromolekularen Bestandteilen (Probenmatrix) der Probe ermöglicht.

Der Begriff "Derivatisierung" bezieht sich auf eine kovalente oder auch insbesondere adsorptive Bindung von Molekülen an der Oberfläche des Trägermaterials. Hierbei kann es sich beispielsweise um synthetische oder natürliche Polymere handeln, die als chemische Diffusionsbarriere verhindern, dass Makromoleküle der Probenmatrix am Trägermaterial

adsorbieren bzw. denaturieren. Der Begriff "Funktionalisierung" bezeichnet insbesondere die Eigenschaften eines jeweiligen Bereiches. So können bestimmte Bereiche des Trägermaterials hydrophob ausgestaltet sein, während andere Bereiche hydrophile Eigenschaften aufweisen. Eine derartige Funktionalisierung kann durch unterschiedliche Derivatisierung der Bereiche erzielt werden. Hierzu können verschiedene Moleküle (z.B. Fettsäuren in einem Bereich, Alkohole in einem anderen Bereich) eingesetzt werden. Es ist jedoch auch möglich, eine unterschiedliche Funktionalisierung durch Variation der Belegungsdichte von Bereichen mit gleichen Molekülen zu erzielen.

Die erfindungsgemäße Verwendung des Trägermaterials in der CEC ermöglicht es, den Analyten von anderen Komponenten der Probe zu trennen, ohne diesen zu verdünnen. In Verbindung mit Isotachophorese ist es in einer Ausführungsform möglich, den Analyten ohne signifikante Erhöhung des Volumens auf eine Trennsäule, insbesondere eine weitere CEC-Säule oder eine μ -HPLC-Säule, zu überführen. Es können sogar Probenvolumina $\leq 10 \mu\text{l}$ aufbereitet werden.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung des Trägermaterials bleibt auch nach wiederholter Injektion komplexer Proben, insbesondere von serum- und zellkulturmedien-haltigen Proben, die Reproduzierbarkeit hinsichtlich Bodenzahlen, Retentionszeit und Auflösung der Säule erhalten.

Die erfindungsgemäße Verwendung des Trägermaterials erlaubt in einer weiteren Ausführungsform sogar die kombinierte Probenaufbereitung und -trennung von komplexen Proben auf einer einzigen CEC-Säule. Diese ist in Bezug auf Trennleistung, Empfindlichkeit, Signal-zu-Rausch-Verhältnis, Selektivität, Lebensdauer der Säule und Kosten der einer auf getrennten Säulen durchgeführten Probenaufbereitung und -trennung

gleichgestellt oder sogar überlegen. Dies ermöglicht erstmals den Einsatz eines solchen Systems in Hochdurchsatz-Verfahren, wie z.B. dem Hochdurchsatzscreening nach potenziellen pharmakologisch aktiven Substanzen.

Es kann bevorzugt sein, die mittels CEC getrennten Analyten vorzugsweise vollautomatisch einer weiteren Analyse, insbesondere unter Anwendung der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, zuzuführen, im Rahmen derer insbesondere die Wechselwirkung des Analyten mit anderen Molekülen detektiert wird. Hierbei kann es sich z.B. um Rezeptor-Ligand-Interaktionen handeln.

Die erfindungsgemäße Verwendung des Trägermaterials zeichnet sich somit insgesamt durch folgende Eigenschaften aus:

- es besteht die Möglichkeit der wiederholten direkten Injektion unbehandelter Proben, insbesondere biologischer Proben auf einer CEC-Säule,
- die Proteinmatrix wird quantitativ entfernt,
- der Analyt kann am oberen Rand der Säule aufkonzentriert und unabhängig von der Matrix quantitativ ab- und aufgetrennt werden,
- hohe Trennleistung, Empfindlichkeit, Genauigkeit, sehr gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis,
- hohes Maß an Reproduzierbarkeit hinsichtlich Bodenzahlen, Retentionszeit und Auflösung der Trennung in der Säule,
- automatischer Betrieb möglich,
- hohe Anzahl an Analysendurchgängen, kontinuierlicher Betrieb der Säule,
- geringe Kosten pro Analyse.

Es ist besonders vorteilhaft, wenn die äußere und/oder Porenoberfläche des Trägermaterials mit hydrophoben und/oder hydrophilen Gruppen und/oder Ionenaustauschergruppen und/oder Affinitätsliganden und/oder chiralen Gruppen derivatisiert und/oder funktionalisiert ist. Das Trägermaterial lässt sich somit individuell hinsichtlich seiner chemischen und/oder physikalischen Trenneigenschaften gestalten.

Die im folgenden aufgeführten funktionalen Gruppen sind besonders geeignet:

hydrophile Gruppen	hydrophobe Gruppen	Ionenaustauscher Gruppen	Affinitätsliganden
-Alkohole, bevorzugt Glycole und Diole -Amide, bevorzugt hydrophile Peptide wie Ser-L-Gly Dipeptid -Calixarene -Kohlenhydrate -hydrophile Aminosäuren, bevorzugt Serin oder Glycin -Proteine, bevorzugt α -Säureglycoprotein -Nitroalkyl	-Alkyl, besonders bevorzugt C1-C40 -Aryl, bevorzugt Phenyl, -Benzyl, -Nitrophenylethyl, -2-(1-Pyrenyl)ethyl -Halogenide -Cyano -SH -hydrophobe Peptide, bevorzugt Glycine-L-Phenylalanine -Ester, bevorzugt Carbonsäure- und Fettsäureester -Alkoxy -Ketone	$-(CH_2)_xSO_3H$ $-(CF_2)_x-SO_3H$ -Aryl- SO_3H $-(CH_2)_x-^+NR_3^-OH$ $-(CF_2)_x-^+NR_3^-OH$ -Aryl- $^+NR_3^-OH$ $-(CH_2)_x-CO_2H$ $-(CF_2)_x-CO_2H$ -Aryl- $-CO_2H$, bevorzugt Benzyl- $-CO_2H$ $R = -Alkyl, -H$ $x = 0 - 30$	-Antikörper -Fab-Fragmente -Proteine, insbesondere Bovine Serum Albumin -Rezeptoren -Metalchelat, insbesondere NTA-Nickel -Borat -DNA -Oligonukleotide -Antisense -Molecular Imprinted Polymer

Zur Trennung von Enantiomerengemischen sind chirale Phasen mit folgenden funktionalen Liganden besonders gut geeignet: Cyclodextrin, Amylose tris(3,5-dimethylphenyl-carbamate), Bovine Serum Albumin, Ristocetin, 1,2-Diphenylethyldiamine und Vancomycin.

Eine Reihe von geeigneten Trägermaterialien sind mit einem Außendurchmesser von 5 µm erhältlich, insbesondere ChromSper 5 Biomatrix (Chrompack), ISRP GFF II und SPS (Regis Technologies), Hisep (Supelco) und Capcell Pak MF (Shiseido).

Der Fachmann kann neben Materialien, wie beispielsweise ChromSper 5 Biomatrix (Chrompack), ISRP GFF II und SPS (Regis Technologies), Hisep (Supelco) und Capcell Pak MF (Shiseido), auf unterschiedliche Verfahren zur Herstellung der stationären Phasen für die erfindungsgemäße Verwendung zurückgreifen.

Als Ausgangsmaterial können anorganische Materialien z.B. silikathaltige, insbesondere poröse, silikathaltige, Materialien oder Glas eingesetzt werden. Diese können, beispielsweise wie in US 4,544,485 beschrieben, auf ihrer äußeren und/oder Porenoberfläche mit Glycerinpropyl modifiziert sein. Eine große Anzahl von Ausgangsmaterialien sind auch kommerziell erhältlich, wie beispielsweise Hypersil (Separations Group), Spherisorb (Phase Separations), Nucleosil (Macherey-Nagel Co.), Zorbax Sil (DuPont), Micropack Si (Varian Associates) oder Baker Silica gel (Baker Chem. Co.).

Auch hydroxylgruppenhaltige organische Polymere oder Copolymere können als Ausgangsmaterial verwendet werden.

Als Ausgangsmaterial eignen sich auch hydrophile organische Copolymere aus beispielsweise Oligoethylenglycol, Glycidylmethacrylat oder Pentaerythroidimethacrylat. Diese können durch Acrylamidderivate der Formel $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NHR}$, wobei R beispielsweise eine lineare und/oder verzweigt-kettige aliphatische Sulfonsäuregruppe und/oder Carbonsäuregruppe ist, funktionalisiert werden. Insbesondere eignen sich auch Mischpolymerisate aus Glycidylmethacrylat und Ethylendimethacrylat, Dihydroxypropylmethacrylat und Ethylendimethacrylat oder aus Glycerinmonomethacrylat und Glycerindimethacrylat.

Für die Synthese insbesondere von Basismaterialien im Korngrößenbereich kleiner $5\text{ }\mu\text{m}$ kann eine Modifikation der Methode von Stöber (Christian Kaiser, Dissertation, Johannes-Gutenberg-Universität, 1996, W. Stöber et al., J. Colloid Interface Sci. 26, 62, 1968) zur Herstellung von hochgeordneten mesoporösen Materialien auf Kieselgelbasis verwendet werden. Der Fachmann kann beispielsweise auch auf das unter DE 195 30 031 beschriebene Verfahren zurückgreifen. Alternativ können auch polydisperse Kieselgele, wie unter US 3,489,516, US 3,656,901 oder US 2,385,217 beschrieben, hergestellt werden. Durch ein Sichtungsverfahren werden Partikel in einem Größenbereich von insbesondere kleiner $5\text{ }\mu\text{m}$ stark angereichert, die dann als Ausgangsmaterial für erfindungsgemäßes Trägermaterial dienen können.

Abhängig davon, mit welchen Liganden das Basismaterial derivatisiert werden soll, kann es vorteilhaft sein, dass die Oberfläche des Ausgangsmaterials bereits mit Epoxygruppen belegt ist. Vernetzte Polymere bestehend aus sogenannten Mischpolymerisaten wie beispielsweise Glycidylmethacrylat und Ethylendimethacrylat enthalten bereits Epoxygruppen.

Es ist aber ebenfalls möglich, Epoxygruppen nach einer dem Fachmann bekannten Vorgehensweise in Ausgangsmaterialien einzuführen. Dies kann insbesondere durch Umsetzung eines Ausgangsmaterials mit 3-Glycidoxypropylsilan, oder durch Umsetzung eines Mischpolymerisates aus beispielsweise Dihydroxypropylmethacrylat und Ethylendi-methacrylat mit Epichlorhydrin geschehen.

Alternative Vorschriften für die Herstellung von Ionenaustauschermaterialien, die auf der Umsetzung von Oxiranringen beruhen, sind in DE 43 33 674 (WO 95/09 964) und in DE 43 33 821 (WO/95/09695) beschrieben worden: Der Fachmann kann diese Vorgehensweisen auch auf Ausgangsmaterialien übertragen, die nur auf der Porenoberfläche mit Oxirangruppen derivatisiert sind.

Weitere Synthese Ansätze sind von Pinkerton (EP 0 173 233) beschrieben worden. Diolhaltige Basisträger werden mit 1,1-Carboxydiimidazole aktiviert (Bethell et al., J. Biol. Chem. 254, 2572, 1979; J. Cjrom., 219, 361, 1981) und anschließend mit einem Tripeptid, insbesondere Glycine-L-Asparginsäure-L-Asparginsäure oder Glycine-L-Serine-L-Glutaminsäure umgesetzt. In einem weiteren Schritt wird die Peptideinheit auf der Außenoberfläche des Trägers mit Hilfe einer Peptidase, beispielsweise Carboxypeptidase A (Exopeptidase, die am Carboxyterminus einer Peptidbindung) hydrolysiert (Williams et al., FEBS Letters, 54, 353-357, 1975). Bei der Verwendung eines Porendurchmessers von zum Beispiel 4 nm kann das Enzym nicht in die Poren eindringen, da es ein Molekulargewicht von 34 Dalton besitzt. Die Auswahl eines geeigneten Enzymes hängt von der Natur des Peptides und der Größe des Porendurchmessers ab.

Für die Synthese kann alternativ auch eine Modifikation des unter US 4,694,092 beschriebenen Verfahrens verwendet werden. Ausgangsmaterialien sind Trägermaterialien, die mit Ionenaustauschergruppen wie beispielsweise Carboxypropyl auf der äußeren und Porenoberfläche belegt sind. Durch eine Plasmabehandlung werden die funktionellen Gruppen auf der Außenoberfläche zu Silanolgruppen umgewandelt, während die Ionenaustauschergruppen auf den Poreninnenoberflächen erhalten bleiben. In einem weiteren Schritt werden die Silanolgruppen mit 3-Glycidooxy-trimethylsilane umgesetzt und anschließend die Epoxygruppe mit verdünnter Schwefelsäure hydrolysiert, um eine hydrophile Außenoberfläche zu erhalten.

Alternativ kann auch eine Modifikation der unter EP 0 537 461 beschriebenen Herstellungsmethode verwendet werden. Als Ausgangsmaterial werden mit Diolen modifizierte Kieselgele verwendet, die mit Fettsäurederivaten unter Ausbildung einer Esterbindung zu beispielsweise Carbonsäure derivatisierten Kieselgelen umgesetzt werden. In einem zweiten Schritt werden die auf der Außenoberfläche befindlichen Esterbindungen mit partikelgebundenen oder freien Esterasen und/oder Lipasen hydrolysiert.

Beispielsweise können auch epoxyhaltige Ausgangsmaterialien verwendet werden, die wie nach DE 43 33 821 zu fettsäurehaltige Ionenaustauschern umgesetzt und wie oben beschrieben mit Esterasen und/oder Lipasen hydrolysiert werden.

Erfindungsgemäß kann es wünschenswert sein, Trägermaterial zu verwenden, das Bereiche auf seiner äußeren und/oder Porenoberfläche aufweist, die eine funktionelle Gruppe in verschiedener Dichte enthalten.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung von Trägermaterial dessen Poren und/oder äußere Oberfläche Bereiche aufweist, die mit Alkylresten der Länge C1 bis C50, vorzugsweise C4 bis C22, besonders bevorzugt C4, C8 und C18 derivatisiert und/oder funktionalisiert sind.

Es ist ebenfalls vorteilhaft, Trägermaterial zu verwenden, dessen Oberfläche Bereiche aufweist, die mit Diolen derivatisiert und/oder funktionalisiert sind.

Ebenso ist es bevorzugt Trägermaterial zu verwenden, das auf seiner äußeren Oberfläche durch Glycin modifiziert ist und dessen Porenoberfläche durch Polypeptide insbesondere Tripeptide modifiziert ist

Ebenso eignet sich Trägermaterial, das auf seiner äusseren Oberfläche mit Polyethylenglycol und/oder Polyoxyethylen modifiziert ist und dessen Porenoberfläche mit hydrophoben Gruppen insbesondere Phenylgruppen und/oder C18 und/oder C8 und/oder Nitril modifiziert ist.

Ebenfalls bevorzugt ist die Verwendung von Trägermaterial, welches im wesentlichen kugelförmig ausgestaltet ist, wobei besonders gute Trennergebnisse bei Verwendung von Trägermaterialien mit einem Aussendurchmesser D von $0.05 \leq D \leq 20 \mu\text{m}$, bevorzugt $0.1 \leq D \leq 5 \mu\text{m}$ erzielt werden. So können z.B. Trägermaterialien der Grösse $0.5 \leq D \leq 3 \mu\text{m}$ eingesetzt werden.

Der Aussendurchmesser der Partikel lässt sich insbesondere mit einem Laser Diffraktions System beispielsweise dem Malvern Mastersizer der Firma Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, bestimmen. Es wird das Prinzip der Laser Streuung nach der Mie Theorie und der Fraunhofer Analyse angewendet. Das Streulicht wird gemessen. Aus diesen Streu-

lichtdaten lässt sich die Partikelgrößenverteilung ableiten. Ein weiteren System zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung nutzt der Sedigraph 5100 Particle Sizer der Firma Micrometrics. In diesem Verfahren werden die zu bestimmenden Partikel in einer Sedimentationslösung mit Röntgenstrahlung bestrahlt und die Strahlung nach Durchgang durch die Probe detektiert. Aus der detektierten Strahlung wird dann die Partikelgrößenverteilung ermittelt.

Ist das Trägermaterial porös ausgestaltet, so ist es vorteilhaft, dass es einen Porendurchmesser d von $0.5 \leq d \leq 100 \text{ nm}$, bevorzugt von $1 \leq d \leq 50 \text{ nm}$, besonders bevorzugt von $2 \leq d \leq 6 \text{ nm}$ aufweist.

Die Messung des Porendurchmessers erfolgt bevorzugt unter Ausnutzung des Prinzips der Gasadsorption, beispielsweise Geräte der Firma Beckman Coulter (OMNISORB oder SA3100) nutzen dieses Prinzip. Dazu wird der trockenen Probe im Vakuum eventuell adsorbiertes Gas entzogen und die Probe auf 77K gekühlt. Bei dieser Temperatur adsorbieren inerte Gase, wie z. B. Stickstoff, Argon oder Krypton auf der Oberfläche der Partikel der Probe. Es wird eine Adsorptionsisotherme aufgenommen, d.h. die adsorbierte Volumen an Gas gegen den angelegten Druck aufgetragen. Aus dieser Isothermen lässt sich unter Anwendung der BET (Brunauer, Emmet, Teller)-Gleichung dann die Porengröße der Partikel ermitteln. Geräte zur Durchführung dieser Messungen werden insbesondere von Beckman Coulter angeboten

Vergleichbare Ergebnisse für den Porendurchmesser liefert ein Verfahren nach Walfort ("Chemisch und enzymatisch modifizierte Umkehrphasen-Trägermaterialien für die HPLC-Integrierte Probenaufbereitung", Dissertation GH Paderborn, 1992), das die ausschlusschromatographischen Eigenschaften der Trägermaterialien ausnutzt. Proteineich-

standards der Gel-Permeationschromatographie, wie beispielsweise Lactatdehydrogenase, Ovotransferrin, Ovalbumin, Carboanhydrase oder Cytochrom C mit unterschiedlichen Molekulargewichten werden in einem geeigneten Puffer gelöst und auf mit dem Trägermaterial gefüllte Säulen injiziert und mit einem geeigneten Puffer oder Gradienten eluiert. Die Zusammensetzung des Eluats wird mittels UV-Detektion bestimmt. Aus dem Molekulargewicht der retenierten Moleküle ergibt sich der Porendurchmesser.

Zur Ausgestaltung eines Trägermaterials mit Affinitätsliganden auf der Porenoberfläche und einer hydrophilen Aussenoberfläche können die oben beschriebenen Verfahren insbesondere das von Pinkerton (EP 0 173 233), Boss (0 537 461) und Takahata (US 4,694,092) ebenfalls angewendet werden. Als ein Beispiel ist hier die Reaktion von Oxirangruppen mit m-Aminophenylborsäure, gefolgt von einer Plasmabehandlung, einer Hydrophilisierung der Außenoberfläche mit 3-Glycidoxymethyltrimethylsilane und abschließender Hydrolyse der Epoxygruppen zu nennen. Ein weiteres Beispiel ist Herstellung von fettsäurehaltigen Affinitätssorbenzien nach DE 43 33 674, gefolgt von einer Hydrolyse der Esterbindungen auf der Außenoberfläche.

Zur Ausgestaltung eines Trägermaterials mit einer hydrophoben Porenoberfläche und einer hydrophilen Außenoberfläche ist das Verfahren von J. Haginaka et al. (Anal. Chem. 61, 2445-2448, 1989), Pinkerton (US 4,544,485, EP 0 173 233), Boos (0 537 461), Kimata et al. (J. Chromatogr. 515, 73-84, 1990) oder Takahata (US 4,694,092) geeignet. Als ein Beispiel ist hier die Derivatisierung der Porenoberfläche mit Glycine-L-Phenylalanine-L-Phenylalanine nach dem Verfahren von Pinkerton oder die Belegung der Porenninnenoberfläche mit C-18 Gruppen nach dem Verfahren von Takahata zu nennen.

Zur Herstellung von Trägermaterialien mit einer hydrophilen Poreninnenoberfläche und einer hydrophoben Außenoberfläche kann das Verfahren von Pinkerton gemäß dem Fachmann bekannten Verfahren modifiziert werden. Die mit 1,1-Carboxydiimidazole aktivierten Partikeloberflächen könnten zum Beispiel mit Phenylalanin-L-Glycin-L-Glycin umgesetzt werden. Nach der Zugabe eines Enzyms wie Carboxypeptidase A wird die Peptideinheit auf der Außenoberfläche entfernt, so daß eine hydrophobe Oberfläche durch die Derivatisierung mit Phenylalanin entsteht.

Zur Herstellung von Trägermaterial mit einer chiralen Innenoberfläche und einer hydrophilen Außenoberfläche kann eine Modifikation des Verfahrens von Takahata verwendet werden. Ein Oxirangruppen belegtes Trägermaterial wird mit 6-Monodeoxy-6-monoamino- β -cyclodextrin umgesetzt und in einem zweiten Schritt zur Entfernung der chiralen Liganden auf der Außenoberfläche mit Plasma behandelt.

Besonders vorteilhaft ist die erfindungsgemäße Verwendung des Trägermaterials in einem CEC-Verfahren zur Probenaufbereitung, wobei die Probe, bestehend aus Analyt und anderen Probenkomponenten (Probenmatrix),

- auf ein CEC-Säulensystem aufgebracht wird,
- durch Anlegen einer elektrischen Spannung ein elektroosmotischer Fluss erzeugt wird, durch den die Probenmoleküle bewegt werden und/oder die Probenmoleküle aufgrund ihres Ladung-zu-Masse-Verhältnisses migrieren,
- die Probenmatrix durch Aufbringen eines Waschpuffers eluiert wird,
- der Analyt durch Aufbringen eines Transferpuffers eluiert wird.

Unter einer CEC-Säule im Sinne des erfindungsgemäßen Verfahrens ist eine Trägermaterialaufnahmeverrichtung zu verstehen, die insbesondere als Kapillarsäule oder Teil eines Kanalsystems auf einem Chip ausgebildet sein kann.

Ebenfalls bevorzugt ist die erfindungsgemäße Verwendung in einem CEC-Verfahren zur kombinierten Probenaufbereitung und Trennung, wobei die Probe, bestehend aus Analyt und anderen Probenkomponenten,

- auf ein CEC-Säulensystem aufgebracht wird,
- durch Anlegen einer elektrischen Spannung ein elektroosmotischer Fluss erzeugt wird, durch den die Probenmoleküle bewegt werden und/oder die Probenmoleküle aufgrund ihres Ladung-zu-Masse-Verhältnisses migrieren,
- die Probenmatrix durch Aufbringen eines Waschpuffers eluiert wird,
- der Analyt durch Aufbringen eines Elutionspuffers aufgetrennt und eluiert wird.

Stationäre Phasen in CEC-Säulen aus Trägermaterialien mit einer hydrophilen Außenoberfläche, bevorzugt durch Derivatisierung mit Alkoholen und einer mit Ionenaustauscherguppen modifizierten Porenoberfläche eignen sich besonders für die Aufreinigung von kleinen geladenen organischen Molekülen aus komplexen wässrigen Lösungen in der CEC. Beispiele sind die Aufreinigung von geladenen Drugs wie Antisense Molekülen aus biologischen Körperflüssigkeiten, zum Beispiel Serum, Plasma oder Urin. Weitere Anwendungen sind die Aufreinigung von Pflanzenschutzmitteln aus Extrakten von Bodenproben oder Pflanzenteilen oder die Überwachung von Synthesen wie zum Beispiel die Markierung

von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen. Eine alternative Anwendung ist die Verwendung der Ionenaustauscher Materialien für die gezielte Erhöhung der Geschwindigkeit der Trennung in der CEC, insbesondere bei niedrigem pH.

Zur Aufreinigung von anionischen Antisense Oligonukleotiden aus Serum mit Verfahren der CEC ist es vorteilhaft in der CEC Trägermaterialien als stationäre Phase zu verwenden, die sich durch eine hydrophile äußere Oberfläche, bevorzugt durch Derivatisierung mit Alkoholen, auszeichnen und eine Porenoberfläche aufweisen, die durch Anionentauscher, bevorzugt $-NR_3^+ OH^-$, mit $R = -Ethyl, -Propyl$, derivatisiert ist.

Ein Trägermaterial mit Affinitätsliganden wie Boratgruppen auf der Porenoberfläche und einer hydrophilen Außenoberfläche ist besonders für die Auftrennung von kohlenhydrathaltigen Verbindungen geeignet, wie zum Beispiel die Kontrolle der enzymatischen Reaktion von Phosphorylasen mit Polyzuckern wie (Glukose)_n.

Weitere Anwendungen der Trägermaterialien sind die Auftrennung von Drugs wie zum Beispiel Hydrocortison aus Serum oder Plasma. Besonders bevorzugt sind hier Trägermaterialien zu verwenden, die auf der Porenoberfläche durch Hydrocortison spezifische Fab-Fragmente funktionalisiert sind und deren äußere Oberfläche z.B. durch Diolgruppen hydrophil gestaltet ist. Die hydrophile Außenoberfläche verhindert die Absorption der Probenkomponenten in wässrigen Lösungen. Die Methode ist insbesondere für komplexe Proben mit einer sehr grossen Anzahl von Inhaltsstoffen wie zum Beispiel Serum und Plasma geeignet.

Für die Aufreinigung von kleinen hydrophilen Molekülen mit dem erfindungsgemäßen CEC-Verfahren aus zum Beispiel organischen Extrakten von Cremes oder die Isolierung von wasserlöslichen Vitaminen aus Mar-

garine wird Trägermaterial als stationäre Phase verwendet, das mit Alkoholgruppen auf der Poreninnenoberfläche und Phenylgruppen auf der Porenaußenoberfläche belegt ist.

Die Abtrennung des Reaktionsproduktes aus Synthesemischungen, die hydrophile Polymere, insbesondere Polyethylenglycol und hydrophile Reaktanden, wie beispielsweise Oligonukleotide enthalten, kann vorzugsweise durch Verwendung von Trägermaterialien als stationäre Phase geschehen, welche folgende Eigenschaften aufweisen: Die Porenoberfläche ist mit Diolen oder Zuckern derivatisiert. Ihre äußere Oberfläche weist durch Derivatisierung mit C8 Alkylresten hydrophobe Eigenschaften auf.

Für die Auftrennung von Enantiomerengemischen wie Temazepam oder Warfarin in biologischen Flüssigkeiten ist ein Trägermaterial geeignet, dass eine hydrophile Außenoberfläche und eine chirale Poreninnenoberfläche besitzt. Beispielsweise kann der Träger auf der Außenoberfläche mit Alkoholen und auf der Poreninnenoberfläche mit Cyclodextrinen belegt sein. Der chirale Ligand 1,2-Diphenylethyldiamine ist insbesondere für die Trennung von Aryl Carbinolen geeignet.

Für die Aufreinigung von kleinen kationischen Molekülen aus Hengst Buffered Saline Solution (HBSS) Puffer wie zum Beispiel Atenolol wird ein Trägermaterial als stationäre Phase verwendet, das mit Carbonsäuregruppen auf der Poreninnenoberfläche und Diolgruppen auf der Porenaußenoberfläche belegt ist. Die Säule wird hier bevorzugt mit einem wässrigen Puffer bei einem pH größer 6 equilibriert, anschließend die Probe auf die Säule aufgebracht und die HBSS Bestandteile durch Anlegen eines elektrischen Feldes entfernt. Zur effizienten Auftrennung und Detektion von Atenolol zu einem Puffer mit einem pH kleiner 3 gewechselt und durch Anlegen eines elektrischen Feldes die Trennung durchgeführt.

Besonders gute Trennergebnisse werden erhalten, wenn die Zusammensetzung der mobilen Phase individuell auf das Trägermaterial abgestimmt wird. Insbesondere kann es gewünscht sein durch einen pH-Wert viele geladene Ionenaustauschermoleküle zu generieren oder die Ladung durch einen pH-Wert, der insbesondere die Protonierung der Ionenaustauschermoleküle begünstigt, zu minimieren. Dabei kann ein wässriger Puffer verwendet werden, es kann aber auch bevorzugt sein, die CEC-Säule mit einem organischen Puffer, zum Beispiel 95% Acetonitril in Wasser beispielsweise in Gegenwart von Ammoniumacetat, pH 4,7 zu equilibrieren. Darüber hinaus kann es bevorzugt sein zum Aufbringen der Probe auf die CEC-Säule einen anderen Puffer zu verwenden als zur Trennung und Detektion des Analyten.

Für die Aufreinigung von Vitamin C aus Flüssigcreme ist beispielsweise ein Trägermaterial geeignet, dass mit C-8 auf der Außenoberfläche und Diol auf der Porenoberfläche belegt ist. Die Säule wird mit einem Puffer equilibriert, der beispielsweise mehr als 90% Acetonitrile enthält. Die Probe wird aufgebracht und die hydrophoben Bestandteile durch Anlegen eines elektrischen Feldes entfernt. Zur effizienten Abtrennung und Detektion wird zu einem Puffer gewechselt, der mehr als 60% wässrige Phase enthält, und durch Anlegen eines elektrischen Feldes die Trennung durchgeführt. Über die Einstellung der Hydrophibizität der mobilen Phase kann die Trennung optimiert werden.

Die Abtrennung von Hydrocortison aus Serum ist insbesondere mit Trägermaterial geeignet, dass Hydrocortison spezifische Fab-Fragmente auf der Poreninnenoberfläche und Alkokole auf der Porenaußenoberfläche belegt ist. Beispielsweise ist das Fab-Fragment so ausgesucht, dass die Bindung und Elution des Antigens bei zwei verschiedenen pH's durchgeführt werden kann. Die Bindung erfolgt beispielsweise bei einem pH

unter 6 in wässrigen Puffer, so dass die Serumbestandteile durch Anlegen eines elektrischen Feldes entfernt werden. Die Elution und Detektion wird nach dem Vorlegen eines Puffer größer pH 7.5 und Anlegen eines elektrischen Feldes durchgeführt.

Die mobile Phase setzt sich vorzugsweise aus Puffersalzen in Gegenwart von anionischen und/oder kationischen und/oder zwitterionischen Ionenpaarreagenzien zusammen, wobei ihre Zusammensetzung der Natur und den Eigenschaften des Analyten zum Erhalt einer guten Trennleistung direkt angepasst werden kann, wie dies z.B. die Ausführungsbeispiele belegen. Es ist aber auch möglich, bei unbekannten Zusammensetzungen des Analyten sogenannte universelle Puffer einzusetzen, die für die Trennung und Elution von Analyten unbekannter Zusammensetzung optimiert wurden.

Zur Erzielung besonders guter Trennergebnisse ist es auch wünschenswert, dass Waschpuffer und Elutionspuffer organische Lösungsmittel enthalten, wobei Waschpuffer mindestens 1% und Elutionspuffer mindestens 20% organisches Lösungsmittel enthalten sollten.

Insgesamt sollten in einer besonders bevorzugten Form des Verfahrens die stationäre und mobile Phase so gewählt werden, dass der elektroosmotische Fluss während Bindung und Elution des Analyten jeweils konstant bleibt oder sich reproduzierbar ändert, wobei ein elektroosmotischer Fluss im Bereich von 0.5 bis 10 mm/s bevorzugt ist. Zur Erzeugung des elektroosmotischen Flusses wird vorzugsweise eine Gleichstrom-Hochspannung eingesetzt.

Das Aufbringen der Probe auf die Säule und das quantitative Entfernen der Matrix wird bevorzugt hydrodynamisch und/oder elektroosmotisch und/oder elektrophoretisch durchgeführt, was zu einer Aufkonzentrie-

rung des Analyten um einen Faktor 10 bis 1000 führt.

Es kann aber auch bevorzugt sein, die Probe im Flash-back Verfahren auf die Säule aufzubringen und zu waschen. Dies vermindert eine mögliche Kontamination der Säule mit Matrixbestandteilen und führt ebenfalls zu einer Aufkonzentrierung der Probe am Kopf der Säule.

Es ist ebenfalls vorteilhaft, die Elution und Trennung der Analyten hydrodynamisch und/oder elektroosmotisch und/oder elektrophoretisch durchzuführen.

Besonders bevorzugt ist die elektroosmotische Elution und Trennung der Analyten, um auch bei Verwendung sehr kurzer Säulen, vorzugsweise ≤ 10 cm, eine ausreichende Bodenzahl zu erhalten.

In einer weiteren Ausführungsform wird während der Elution durch Isotachophorese eine weitere Aufkonzentrierung des Analyten um einen Faktor von 10 bis 1000 erreicht. Der Analyt kann so beispielsweise ohne große Volumenänderung von einer separaten Probenaufbereitungssäule auf eine Trennsäule überführt werden.

Zur Erhöhung der Selektivität des Verfahrens und/oder zur Erhöhung des elektroosmotischen Flusses werden bevorzugt auch Mischungen verschiedener Trägermaterialien als stationäre Phase eingesetzt. Der besondere Vorteil dieser Mischungen ist es, dass sie eine optimale Anpassung an die Eigenschaften der mobile Phase und der Probe erlauben und somit eine empfindliche und selektive Trennung gewährleisten.

Soll im Anschluss an Trennung und Elution eine Detektion der Analyte erfolgen, so ist es insbesondere bei massenspektrometrischer Detektion wünschenswert, dass die Puffersalze und/oder anionischen und/oder

kationischen und/oder zwitterionischen Ionenpaarreagenzien bei Raumtemperatur flüchtig sind.

Zur genauen Charakterisierung der Zusammensetzung des Analyten sowohl qualitativ als auch quantitativ ist es in einer bevorzugten Ausführungsform möglich, im Anschluss an Trennung und/oder Elution verschiedene spektrometrische und spektroskopische Analysenverfahren durchzuführen. Besonders vorteilhaft sind hier die Verfahren der Massenspektrometrie und/oder optischen Detektion z.B. durch Lichtstreuung, insbesondere Condensation Nucleation Light Scattering Detection (Szostek et al., 1997, Analytical Chemistry, 69, 2955-2962) und/oder Fluoreszenzdetektion und/oder elektrochemischen Detektion und/oder Leitfähigkeitsdetektion und/oder Refractive Index Detektion, insbesondere Laser-based Refractive Index Detektion gekoppelt mit Absorptionsdetektion (Anal. Chem. 59, 1632-1636, 1987) und/oder Laser-based Refractive Index Detektion using Backscatter (US 5,325,170) und/oder Chemiluminescence Nitrogen specific Detection (LC-GC 12, 5, 287-293, 1999) und/oder Thermooptische Detektion, insbesondere Thermooptische Absorptionsdetektion (Anal. Chem. 61, 37-40, 1989) und/oder Laser Induced Capillary Vibration (Anal. Chem. 63, 2216-2218, 1991). So wird z.B. im Ausführungsbeispiel 1 die UV-Detektion eingesetzt.

Es kann aber ebenfalls bevorzugt sein, die Analytfraktionen im Anschluss an die Trennung einem Fraktionssammler zuzuführen, somit einzeln zu sammeln und diese einer weiteren Verwendung zuzuführen.

In einer weiteren Ausführungsform kann auch der Transfer auf ein weiteres Säulensystem zur weiteren Trennung wünschenswert sein.

Besonders vorteilhaft ist die Möglichkeit der parallelisierten Durchführung des Verfahrens in einer Vielzahl von CEC-Säulensystemen, die miteinander verbunden sind.

Erfindungsgemäß enthält eine CEC-Vorrichtung bevorzugt folgende Komponenten:

Trägermaterialaufnahmeeinheit mit mindestens einem Einlass und mindestens einem Auslass, gepackt mit Trägermaterial, welches porös ausgestaltet ist und dessen Oberfläche sich aus einer äusseren und einer Porenoberfläche zusammensetzt, wobei die äussere Oberfläche von der Porenoberfläche unterscheidbare Bereiche unterschiedlicher Derivatisierung und/oder Funktionalität aufweist,

mindestens zwei Gefässen zur Aufnahme mobiler Phase, und

mindestens einer Spannungsquelle.

Besonders bevorzugt ist eine CEC-Vorrichtung, in der zusätzlich eine Druckerzeugungseinrichtung zur Beaufschlagung der Trägermaterialaufnahmeeinheit mit Druck vorgesehen ist.

Ebenfalls ist es bevorzugt, dass ein System zum automatisierten Wechseln der Gefässe zur Aufnahme der mobilen Phase vorgesehen ist.

Darüber hinaus ist es vorteilhaft, die Trägermaterialaufnahmeeinheit an mindestens einen Detektor zu koppeln, wobei der Detektor insbesondere als Massenspektrometer und/oder optischer Detektor insbesondere UV-Detektor, Lichtstreuungsdetektor, besonders bevorzugt Condensation Nucleation Light Scattering Detektor und/oder Fluoreszenzdetektor

und/oder elektrochemischer Detektor und/oder Leitfähigkeitsdetektor und/oder Refractive Index Detektor, insbesondere Laser-based Refractive Index Detektor gekoppelt mit Absorptionsdetektion und/oder Laser-based Refractive Index Detektor using Backscatter und/oder Chemiluminescence Nitrogen specific Detector und/oder Thermooptischer Detektor, insbesondere Thermooptischer Absorptionsdetektor und/oder Laser Induced Capillary Vibrationsdetektor ausgebildet ist.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist die Trägermaterialaufnahmeeinheit als Kapillarsäule ausgebildet.

Ebenso ist es bevorzugt, dass die Trägermaterialaufnahmeeinheit der erfindungsgemäßen Vorrichtung als Teil eines Kanalsystems auf einem Chip ausgebildet ist.

Weiterhin ist es vorteilhaft, dass die Kapillarsäule und der Chip aus Kunststoff und/oder Glas und/oder Fused Silica und/oder Keramik und/oder Elastomer und/oder Polymeren bestehen.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung sind mindestens zwei Trägermaterialaufnahmeeinheiten vorgesehen sind, die miteinander über ein Kapillarsystem und/oder ein Kanalsystem verbunden sind, wobei bevorzugt das Kanalsystem und/oder Kapillarsystem mindestens einen Auslass aufweist.

Darüber hinaus ist es in einer bevorzugten Ausführungsform vorteilhaft, dass der Auslass der Trägermaterialaufnahmeeinheit einen vom Einlass abweichenden Innen- und/oder Aussendurchmesser aufweist.

Besonders vorteilhaft ist es, wenn der Auslass als Elektrospray-Einrichtung ausgebildet ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist eine Vielzahl, insbesondere 2 bis 50, besonders bevorzugt 2 bis 16 Trägermaterialaufnahmeeinheiten parallel und/oder zweidimensional angeordnet.

Es ist ebenfalls bevorzugt, dass die mindestens eine Trägermaterialaufnahmeeinheit der erfindungsgemäßen Vorrichtung eine Mischung verschiedener Sorten Trägermaterialien enthält, wobei jede Sorte Trägermaterial porös ausgestaltet ist und seine Oberfläche sich aus einer äusseren und einer Porenoberfläche zusammensetzt, wobei die äussere Oberfläche von der Porenoberfläche unterscheidbare Bereiche unterschiedlicher Derivatisierung und/oder Funktionalität aufweist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Vorrichtung ist die Probenaufnahmevorrichtung zur Aufnahme von Proben mit einem Volumen V von $0.5 \text{ nl} \leq V \leq 100 \text{ } \mu\text{l}$ ausgestaltet. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung von CEC-Säulen mit einer Länge von 0.1 bis 100 cm und einem Durchmesser $\leq 500 \text{ } \mu\text{m}$.

Unter einer CEC-Säule im Sinne der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist eine Trägermaterialaufnahmeeinheit zu verstehen, die insbesondere als Kapillarsäule oder Teil eines Kanalsystems auf einem Chip ausgebildet sein kann.

Ausführungsformen der Vorrichtung werden im folgenden unter Bezug auf die beigefügten Abbildungen erläutert.

Abbildung 1 zeigt ein CEC-Säulensystem, das aus einer einzelnen Säule zur Probenaufbereitung und/oder Trennung besteht.

Abbildung 2 zeigt die Kopplung eines CEC-Säulensystems an einen De-

tektor, hier ein Massenspektrometer.

Abbildung 3 zeigt die Kopplung eines CEC-Säulensystems an eine weitere Säule.

Abbildung 4 zeigt die Kopplung eines CEC-Säulensystems an einen Fraktionssammler.

Abbildung 5 zeigt ein CEC-Chipsystem.

Abbildung 6 zeigt eine mögliche Ausführungsform eines CEC-Chipsystems, das mit einem Kapillarsystem gekoppelt ist.

Abbildung 7 zeigt beispielhaft eine mögliche Ausführungsform eines μ -Total Analysis Systems.

Abbildung 8 zeigt beispielhaft ein Partikel eines porösen Trägermaterials.

Abbildung 9 zeigt das Elektropherogramm eines Analytgemisches, getrennt auf einer CEC-Säule gepackt mit ISPR GFFII-S5-80.

Abbildung 10 zeigt das Elektropherogramm eines Analytgemisches, getrennt auf einer CEC-Säule gepackt mit SPS 5PM-S5-100-Phenyl.

Abbildung 11 zeigt das Elektropherogramm eines Analytgemisches, getrennt auf einer CEC-Säule gepackt mit SPS 5PM-S5-100-CN.

Abbildung 12 zeigt das Elektropherogramm von Benzocain aus reinem Rattenserum, getrennt auf einer CEC-Säule gepackt mit SPS 5PM-S5-100-CN.

Abbildung 13 zeigt das Elektropherogramm von Benzocain aus reinem Hundeplasma, getrennt auf einer CEC-Säule gepackt mit SPS 5PM-S5-100-CN.

Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform der Vorrichtung ist in Abbildung 1 dargestellt. Eine CEC-Säule (30), die mit erfindungsgemäßem Trägermaterial (60) gepackt ist, taucht mit beiden Enden in Behälter (90) mit mobiler Phase (120) ein. Die Spannungsquelle (10) dient zum Anlegen einer Spannung zwischen beiden Enden der Säulen. Die Spannung ermöglicht die Ausbildung eines elektroosmotischen Flusses in der Säule. Zusätzlich kann noch eine Vorrichtung zur Beaufschlagung der Behälter mit Druck angebracht werden. Das Anlegen von Druck gleichmäßig an beiden Säulenenden wirkt einer Ausgasung der Pufferlösungen und somit der Bildung von Luftblasen in der Säule entgegen. Ein Säulenende ist zur Aufnahme der Probe ausgebildet. Eine Wechsellvorrichtung ermöglicht das Wechseln der Behälter (90) und somit den Austausch bzw. die Anpassung der Pufferlösungen (120) an den Verfahrensschritt. Durch Anbringen beispielsweise, wie in Abbildung 1 skizziert, eines Detektors (150) direkt auf der Säule kann der Analyt direkt detektiert und analysiert werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Vorrichtung ist es bevorzugt, dass das Säulensystem aus mindestens einer CEC-Säule zur Probenaufbereitung und mindestens einer CEC-Säule zur Trennung des Analyten besteht, die miteinander über ein Kapillarsystem verbunden sind, wobei dieses Kapillarsystem in einer besonders bevorzugten Ausführungsform mindestens einen Auslass aufweist, über den die Probenmatrix entfernt werden kann.

Darüber hinaus ist es ebenfalls möglich, eine CEC-Säule (30) nur zur Probenaufbereitung zu verwenden. Eine mögliche Ausführungsform ist in Abbildung 3 dargestellt. Dieses Beispiel zeigt die Kombination einer CEC-Säule (30) mit einer weiteren Säule (170), welche auf einem Chip angeordnet sind. Es ist auch möglich, den Analyten nach Abtrennung der Probenmatrix auf andere Analyse- bzw. Trennsysteme zu überführen.

Die Vorrichtung kann ebenfalls eine Kopplung des Säulensystems an mindestens einen Detektor, insbesondere Massenspektrometer und/oder Lichtstreuendetektor oder sonstigen optischen Detektor und/oder elektrochemischen Detektor und/oder Fluoreszenzdetektor und/oder Leitfähigkeitsdetektor und/oder Refractive Index Detektor, insbesondere Laser-based Refractive Index Detektor gekoppelt mit Absorptionsdetektion und/oder Laser-based Refractive Index Detektor using Backscatter und/oder Chemiluminescence Nitrogen specific Detector und/oder Thermooptischer Detektor, insbesondere Thermooptischer Absorptionsdetektor und/oder Laser Induced Capillary Vibrationsdetektor (150), vorsehen. Diese bevorzugte Ausführungsform ist in Abbildung 2 anhand der Kopplung mit einem Massenspektrometer, welches eine Elektrospray-Vorrichtung (230) aufweist, skizziert. Zur Kopplung mit einem Detektor kann es bevorzugt sein, dass der Auslass des Säulensystems einen vom Einlass abweichenden Innen- und/oder Aussendurchmesser aufweist.

Darüber hinaus ist es in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Vorrichtung vorgesehen, dass das Säulensystem (30) an einen Fraktionssammler und/oder ein weiteres Säulensystem gekoppelt sein kann. Dies kann beispielsweise durch direkte Kopplung geschehen. In einer bevorzugten Ausführungsform (Abbildung 4) wird zur Fraktions-

sammlung eine Spannung zwischen dem Einlaß der Säule und beispielsweise einer Gold-beschichteten Maldi-Platte (200) (Meeting Abstract, Advances in Mass Spectrometry, Jan 7-8, 1999, Orlando, Florida, USA) angelegt. Das Eluat wird zerstäubt und der Analyt wird gezielt in einzelnen Vertiefungen der Platte gesammelt.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform ist das CEC-Säulensystem auf einem Chip (300) angeordnet (Abbildung 5). Hier dargestellt ist ein Säulensystem bestehend aus einer Trägermaterialaufnahmeinheit (30) mit erfindungsgemäßem Trägermaterial (60), einem Probenreservoir (290) und drei Pufferreservoiren (260). Das System ist so konzipiert, dass jedes Reservoir eine Elektrode aufnehmen kann. So kann wahlweise eine Spannung zwischen verschiedenen Reservoirs angelegt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Ansteuerung und Schaltung der Elektroden automatisch, wobei die genauen Schaltpläne durch Computerprogramme verwaltet werden können.

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform ist das Chipsystem (300) mit Glaskapillaren bzw. CEC-Säulen (30) aus Fused-Silica kombiniert. Ein Beispiel für diese Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist in Abbildung 6 skizziert.

Zur Herstellung der Kapillaren und Chipsysteme ist es bevorzugt, Materialien wie Kunststoff, Glas, Fused Silica, Keramik, Elastomere oder Polymere zu verwenden.

Die Herstellung geeigneter Chips kann beispielsweise durch die Anwendung der Photolithographie in Verbindung mit Ätztechniken erfolgen. Dies wurde z.B. von J. P. Landers (Handbook of Capillary Electrophoresis, 1997, CRC Press, S. 828) für die Herstellung von Chips für die Anwendung in der Kapillarelektrophorese beschrieben. Materialien wie Glas

oder Fused Silica werden mit einer photoempfindlichen Substanz beschichtet. Durch Belichtung wird mit Hilfe einer Maske das gewünschte Kanalsystem auf das Substrat übertragen und z.B. in einem Bad aus verdünnter HF/NH₄F in das Substrat geätzt. Für Substrate aus Fused Silica ist es notwendig, als Ätzmaske einen dünnen Gold/Chrom-Film auf das Substrat aufzutragen.

Je nach Material, das zur Herstellung der Kapillaren bzw. Trägermaterialaufnahmeeinheiten für die CEC-Säulen und Chipsysteme eingesetzt wird, kann es zur Verhinderung von unspezifischen Reaktionen der Probe mit beispielsweise freien Silanol-Gruppen der Kapillarinnenseite wünschenswert sein, diese zu beschichten. Dies geschieht vorteilhaft mit PVA oder Polyacrylamid.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform der Vorrichtung stellt das Säulensystem eine Komponente eines Total Analysis Systems dar.

Ein mögliches Total Analysis System ist in Abbildung 7 dargestellt. Ein solches System stellt eine Gesamtheit eines Analysesystems dar und kann gleichermaßen Probenaufbereitung und Analyse und ggf. vorgelagerte und/oder nachfolgende Schritte umfassen. Das in Abbildung 7 dargestellte μ TAS umfasst die Markierung eines Proteins mit einem Farbstoff, die Abtrennung des Farbstoffes und des nichtmarkierten Proteins über eine mit erfindungsgemäßem Trägermaterial (60) gepackte CEC-Säule (30) und der Detektion des markierten Proteins. Das hier skizzierte System kann z.B. auf einem Chip integriert sein, wobei die runden Vertiefungen jeweils Elektroden zur Anlegung von Spannung aufnehmen können.

Eine weitere Ausführungsform sieht eine Parallelisierung einer Vielzahl von CEC-Säulensystemen vor, in denen die Probenaufbereitung und -

trennung parallel durchgeführt wird. Bei diesen Säulensystemen handelt es sich um Chipsysteme oder Kapillarsysteme oder Kombinationen aus beiden. Diese Kopplung mehrerer Systeme ist besonders im Hochdurchsatzscreening vorteilhaft, da sie die parallele Aufbereitung und Trennung einer Vielzahl von Proben erlaubt, die dann weiter untersucht werden können.

Abbildung 8 zeigt beispielhaft ein Partikel eines porösen Trägermaterials. Die Oberfläche dieses Trägermaterials lässt sich in eine äussere Oberfläche (510) und eine Porenoberfläche (540) unterteilen.

Abbildung 9 zeigt das Elektropherogramm eines Analytgemisches in einer Modellmatrix. Die Durchführung erfolgte mit einer CEC-Säule, gefüllt mit ISRP GFFII-S5-80 (Porengröße 8 nm). Die Länge der gepackten Kapillare: 8,3 cm. Innendurchmesser 100 µm. Detektionswellenlänge: 210 nm. Weitere Bedingungen siehe Ausführungsbeispiel 1.

Abbildung 10 zeigt das Elektropherogramm eines Analytgemisches in einer Modellmatrix. Die Durchführung erfolgte mit einer CEC-Säule, gefüllt mit SPS 5PM-S5-100-Phenyl (Porengröße 10 nm). Länge der gepackten Kapillare: 8.3 cm. Innendurchmesser 100 µm. Detektionswellenlänge: 210 nm. Weitere Bedingungen siehe Ausführungsbeispiel 2.

Abbildung 11 zeigt das Elektropherogramm eines Analytgemisches in einer Modellmatrix. Die Durchführung erfolgte mit einer CEC-Säule, gefüllt mit SPS 5PM-S5-100-CN (Porengröße 10 nm). Länge der gepackten Kapillare: 8,3 cm. Innendurchmesser: 100 µm. Detektionswellenlänge: 210 nm. Weitere Bedingungen siehe Ausführungsbeispiel 3.

Abbildung 12 zeigt das Elektropherogramm von Benzocain aus reinem Rattenserum. Die Durchführung erfolgte mit einer CEC-Säule, SPS 5PM-S5-100-CN der Firma Regis® (Porengröße 10 nm). Länge der gepackten Kapillare: 8,3 cm. Innendurchmesser: 100 µm. Detektionswellenlänge: 210 nm. Weitere Bedingungen siehe Ausführungsbeispiel 4.

Abbildung 13 zeigt das Elektropherogramm von Benzocain aus reinem Hundeplasma. Die Durchführung erfolgte mit einer CEC-Säule, SPS 5PM-S5-100-CN der Firma Regis® (Porengröße 10 nm). Länge der gepackten Kapillare: 8,3 cm. Innendurchmesser: 100 µm. Detektionswellenlänge: 210 nm. Weitere Bedingungen siehe Ausführungsbeispiel 5.

Ausführungsbeispiel 1

Trennung eines Analytgemisches in Modellmatrix auf einer mit ISRP GFFII-S5-80 gepackten CEC-Säule

Verwendete Materialien:

Die CEC-Säule mit einer Länge von 8.3 cm und einem Innendurchmesser von 100 µm wurde mit Pinkerton ISRP GFFII-S5-80 der Firma Regis® Technologies, Inc., Austin, USA, gepackt. Die verwendeten Partikel hatten einen Durchmesser von 5 µm und eine Porengröße von 8 nm.

Der Waschpuffer bestand aus 5% Acetonitril, 95% Wasser, 5mM Ammoniumacetat (pH 8,5). Der Elutionspuffer bestand aus 40% Acetonitril, 60% Wasser, 5 mM Ammonium-acetat (pH 8,5).

Die Lösung enthielt FBS (Fetal Bovine Serum) in einer Konzentration von 10 mg/ml, Thioharnstoff, Acetaminophen, Benzocain, Propranolol und Chinin je 1 mg/ml. Diese Probenlösung wird in dem nachfolgenden Text als "Analytgemisch in Modellmatrix" bezeichnet.

Vorrichtung

Zur Durchführung der Trennung des Analytgemisches in einer Modellmatrix wurde die in Abbildung 1 dargestellte Vorrichtung eingesetzt. Die mit ISRP GFFII-S5-80 gepackte Säule tauchte mit je einem Ende in Behälter zur Aufnahme von Pufferlösung ein. Mit Hilfe einer Spannungsquelle (10) wurde eine Spannung zwischen beiden Enden der Säule angelegt.

Säulenvorbereitung

Die Säulenvorbereitung wurde bei 15°C in 2 Stufen durchgeführt:

Die Säule wurde zunächst mit Trennpuffer äquilibriert. Während dieses Vorgangs fand im Abstand von 5 min jeweils eine stufenweise Erhöhung der Spannung in 5 kV Schritten von -5 kV auf -20 kV statt. Dabei war der Inletpufferbehälter (Pufferbehälter, in den der Einlass der Säule eintaucht) mit einem Druck von 5 bar beaufschlagt. Dann wurden beide Puffergefäße mit 10 bar Druck beaufschlagt und eine Spannung von -15 kV angelegt. Die Stabilität der Säule wurde währenddessen durch Messung des Stroms und der UV-Adsorption (210 nm) kontrolliert.

Die 2. Äquilibrierungsphase erfolgte in Waschpuffer und dauerte 12 min. Dabei wurde eine Spannung von -15 kV und an beiden Pufferbehältern ein Druck von 10 bar angelegt. Der Strom und die Spannung wurden ebenfalls kontrolliert.

Nach Abschluss der 2. Phase waren der Strom und die UV-Adsorption stabil.

Trennungen

Während des gesamten Betriebes wurden die Puffer, die Proben und die Trennkapillare auf 15°C temperiert.

Die Probe (Analytgemisch in Modellmatrix) wurde elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von -5kV über 3 sec auf die Säule geladen. Im Anschluss daran wurde zur Verhinderung einer möglichen Diffusion der Probe in das Puffergefäß eine geringe Menge Waschpuffer, ein sogenannter Pufferplug, unter denselben Bedingungen auf die Säule geladen.

Anschliessend wurde die Probe durch das Aufbringen des Waschpuffers bei einer Spannung von -15 kV und unter Anlegen eines Druckes auf

beide Enden der Säule von 10 bar gewaschen dabei wurden die Proteine und Salze aus der Modellmatrix von der CEC-Säule entfernt. Nach 3 min erfolgte ein Wechsel vom Waschpuffer auf den Elutionspuffer. Die Bedingungen -15 kV und 10 bar wurden beibehalten. Der Thioharnstoff eluierte bei 1.48 min, Acetaminophen bei 2.27 min, Benzocain bei 4,88 min, Propranolol bei 4,99 min und Chinin bei 5,67 min. Das Elektropherogramm dieser Trennung ist in Abbildung 9 dargestellt.

Ausführungsbeispiel 2

Trennung eines Analytgemisches in Modellmatrix auf einer mit SPS 5PM-S5-100-Phenyl gepackten CEC-Säule

Verwendete Materialien:

Die CEC-Säule mit einer Länge von 8.3 cm und einem Innendurchmesser von 100 µm wurde mit SPS 5PM-S5-100-Phenyl der Firma Regis® Technologies, Inc., Austin, USA, gepackt. Die verwendeten Partikel hatten einen Durchmesser von 5µm und eine Porengröße von 10 nm.

Der Waschpuffer bestand aus 5% Acetonitril, 95% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat (pH 4,7). Der Elutionspuffer bestand aus 15% Acetonitril, 85% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat (pH 4,7).

Die Lösung enthielt FBS (Fetal Bovine Serum) in einer Konzentration von 10 mg/ml, Thioharnstoff, Acetaminophen, Benzocain, Propranolol und Chinin je 1 mg/ml. Diese Probenlösung wird im nachfolgenden Text als "Analytgemisch in Modellmatrix" bezeichnet.

Vorrichtung

Zur Durchführung der Trennung des Analytgemisches in einer Modellmatrix wurde die in Abbildung 1 dargestellte Vorrichtung eingesetzt. Die

mit SPS 5PM-S5-100-Phenyl gepackte Säule tauchte mit je einem Ende in Behälter zur Aufnahme von Pufferlösung ein. Mit Hilfe einer Spannungsquelle (10) wurde eine Spannung zwischen beiden Enden der Säule angelegt.

Säulenvorbereitung

Die Säulenvorbereitung wurde gemäß Ausführungsbeispiel 1 durchgeführt.

Trennungen

Während des gesamten Betriebes wurden die Puffer, die Proben und die Trennkapillare auf 15°C temperiert.

Die Probe (Analytgemisch in Modellmatrix) wurde elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von -5kV über 3 sec auf die Säule geladen. Im Anschluss daran wurde zur Verhinderung einer möglichen Diffusion der Probe in das Puffergefäß eine geringe Menge Waschpuffer, ein sogenannter Pufferplug, unter denselben Bedingungen auf die Säule geladen.

Anschließend wurde die Probe durch das Aufbringen des Waschpuffers bei einer Spannung von -15 kV und unter Anlegen eines Druckes auf beide Enden der Säule von 10 bar gewaschen. Dabei wurden die Proteine und Salze aus der Modellmatrix entfernt. Nach 6 min wurde der Waschpuffer durch einen Elutionspuffer ersetzt. Die Bedingungen -15 kV und 10 bar wurden beibehalten. Der Thioharnstoff eluierte bei 1,94 min, Acetaminophen bei 4,23 min, Propranolol und Chinin bei 11,34 min und Benzocain bei 18,25 min. Das Elektropherogramm dieser Trennung ist in Abbildung 10 dargestellt.

Ausführungsbeispiel 3

Trennung eines Analytgemisches in Modellmatrix auf mit SPS 5PM-S5-100-CN gepackter CEC-Säule

Verwendete Materialien

Die CEC-Säule mit einer Länge von 8.3 cm und einem Innendurchmesser von 100 µm wurde mit SPS 5PM-S5-100-CN der Firma Regis® Technologies, Inc., Austin, USA, gepackt. Die verwendeten Partikel hatten einen Durchmesser von 5 µm und eine Porengröße von 10 nm.

Der Waschpuffer bestand aus 5% Acetonitril, 95% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat pH 4,7. Der Elutionspuffer bestand aus 15% Acetonitril, 85% Wasser, 5 mM ,pH 4,7.

Die Lösung enthielt FBS (Fetal Bovine Serum) in einer Konzentration von 10 mg/ml, Thioharnstoff, Acetaminophen, Benzocain, Propranolol und Chinin je 1 mg/ml. Diese Probenlösung wird in nachfolgenden Text als Analytgemisch in Modellmatrix bezeichnet.

Vorrichtung

Zur Durchführung der Trennung des Analytgemisches in einer Modellmatrix wurde die in Abbildung 1 dargestellte Vorrichtung eingesetzt. Die mit SPS 5PM-S5-100-CN gepackte Säule tauchte mit je einem Ende in Behälter zur Aufnahme von Pufferlösung ein. Mit Hilfe einer Spannungsquelle (10) wurde eine Spannung zwischen beiden Enden der Säule angelegt.

Säulenvorbereitung

Die Säulenvorbereitung wurde gemäß Ausführungsbeispiel 1 durchge-

führt.

Trennungen

Während des gesamten Betriebes wurden die Puffer, die Proben und die Trennkapillare auf 15°C temperiert.

Die Probe (Analytgemisch in Modellmatrix) wurde elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von -5kV über 3 sec auf die Säule geladen. Im Anschluss daran wurde zur Verhinderung einer möglichen Diffusion der Probe in das Puffergefäß eine geringe Menge Waschpuffer, ein sogenannter Pufferplug, unter denselben Bedingungen auf die Säule geladen.

Anschließend wurde die Probe durch das Aufbringen des Waschpuffers bei einer Spannung von -15 kV und unter Anlegen eines Druckes auf beide Enden der Säule von 10 bar gewaschen. Dabei wurden die Proteine und Salze aus der Modellmatrix entfernt. Nach 5 min wurde der Waschpuffer durch einen Elutionspuffer ersetzt. Die Bedingungen -15 kV und 10 bar wurden beibehalten. Der Thioharnstoff eluierte bei 1.87 min, Acetaminophen bei 3,43 min, Benzocain, Propranolol und Hydrocortison bei 10,39 min und Chinin bei 11,87 min. Das Elektropherogramm dieser Trennung ist in Abbildung 11 dargestellt.

Ausführungsbeispiel 4

Trennung von Benzocain in Rattenserum

Verwendete Materialien

Die CEC-Säule mit einer Länge von 8.3 cm und einem Innendurchmesser von 100 µm wurde mit SPS 5PM-S5-100-CN der Firma Regis® Technologies, Inc., Austin, USA, gepackt. Die verwendeten Partikel hatten

einen Durchmesser von 5 μm und eine Porengröße von 10 nm.

Der Waschpuffer bestand aus 5% Acetonitril, 95% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat pH 4,7. Der Elutionspuffer bestand aus 15% Acetonitril, 85% Wasser, 5 mM ,pH 4,7.

Die Probe bestand aus Rattenserum dotiert mit Benzocain in einer Konzentration von 0,5 mg/ml Serum.

Vorrichtung

Die Vorrichtung entsprach der aus Ausführungsbeispiel 3.

Säulenvorbereitung

Die Säulenvorbereitung wurde gemäß Ausführungsbeispiel 3 durchgeführt.

Trennungen

Während des gesamten Betriebes wurden die Puffer, die Proben und die Trennkapillare auf 15°C temperiert.

Die Probe wurde elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von -5kV über 3 sec auf die Säule geladen. Im Anschluß daran wurde zur Verhinderung einer möglichen Diffusion der Probe in das Puffergefäß eine geringe Menge Waschpuffer, ein sogenannter Pufferplug, unter denselben Bedingungen auf die Säule geladen.

Anschließend wurde die Probe durch das Aufbringen des Waschpuffers bei einer Spannung von -15 kV und unter Anlegen eines Druckes auf beide Enden der Säule von 10 bar gewaschen. Dabei wurden die Proteine und Salze aus der Modellmatrix entfernt. Nach 5 min wurde der

Waschpuffer durch einen Elutionspuffer ersetzt. Die Bedingungen -15 kV und 10 bar wurden beibehalten. Das Benzocain eluierte bei 12,75 min. Das Elektropherogramm dieser Trennung ist in Abbildung 12 dargestellt.

Ausführungsbeispiel 5

Trennung von Benzocain in Hundeplasma

Verwendete Materialien

Die CEC-Säule mit einer Länge von 8.3 cm und einem Innendurchmesser von 100 µm wurde mit SPS 5PM-S5-100-CN der Firma Regis® Technologies, Inc., Austin, USA, gepackt. Die verwendeten Partikel hatten einen Durchmesser von 5µm und eine Porengröße von 10 nm.

Der Waschpuffer bestand aus 5% Acetonitril, 95% Wasser, 5 mM Ammoniumacetat pH 4,7. Der Elutionspuffer bestand aus 15% Acetonitril, 85 % Wasser, 5 mM, pH 4,7.

Die Probe bestand aus Hundeplasma dotiert mit Benzocain in einer Konzentration von 0,5 mg/ml Plasma

Vorrichtung

Die Vorrichtung entsprach der aus Ausführungsbeispiel 3.

Säulenvorbereitung

Die Säulenvorbereitung wurde gemäß Ausführungsbeispiel 3 durchgeführt.

Trennungen

Während des gesamten Betriebes wurden die Puffer, die Proben und die

Trennkapillare auf 15°C temperiert.

Die Probe wurde elektrokinetisch durch Anlegen einer Spannung von -5kV über 3 sec auf die Säule geladen. Im Anschluß daran wurde zur Verhinderung einer möglichen Diffusion der Probe in das Puffergefäß eine geringe Menge Waschpuffer, ein sogenannter Pufferplug, unter denselben Bedingungen auf die Säule geladen.

Anschließend wurde die Probe durch das Aufbringen des Waschpuffers bei einer Spannung von -15 kV und unter Anlegen eines Druckes auf beide Enden der Säule von 10 bar gewaschen. Dabei wurden die Proteine und Salze aus der Modellmatrix entfernt. Nach 5 min wurde der Waschpuffer durch einen Elutionspuffer ersetzt. Die Bedingungen -15 kV und 10 bar wurden beibehalten. Das Benzocain eluierte bei 11,38 min. Das Elektropherogramm dieser Trennung ist in Abbildung 13 dargestellt.

Ansprüche

1. Verwendung von Trägermaterial für die Kapillar-Elektrochromatographie (CEC), dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial porös ausgestaltet ist und die Oberfläche sich aus einer äußeren und einer Porenoberfläche zusammensetzt, wobei die äußere Oberfläche von der Porenoberfläche unterscheidbare Bereiche unterschiedlicher Derivatisierung und/oder Funktionalität aufweist.
2. Verwendung von Trägermaterial nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Bereiche unterschiedlicher Derivatisierung und/oder Funktionalität homogen und/oder heterogen auf der äußeren und/oder Porenoberfläche verteilt sind.
3. Verwendung von Trägermaterial nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Poren- und/oder äußere Oberfläche mit hydrophoben und/oder hydrophilen Gruppen und/oder Ionenaustauschergruppen und/oder Affinitätsliganden und/oder chiralen Gruppen derivatisiert und/oder funktionalisiert ist.
4. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Poren- und/oder äussere Oberfläche Bereiche aufweist, die mit Alkylresten der Länge C1 bis C50, vorzugsweise C4 bis C22, besonders bevorzugt C4, C8 und C18 derivatisiert und/oder funktionalisiert sind.
5. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Poren- und/oder äussere Oberfläche Bereiche aufweist, die mit Diolen derivatisiert

und/oder funktionalisiert sind.

6. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial im wesentlichen kugelförmig ausgestaltet ist und einen Aussendurchmesser D von $0.05 \leq D \leq 20 \mu\text{m}$, bevorzugt $1 \leq D \leq 5 \mu\text{m}$, besonders bevorzugt $0.5 \leq D \leq 3 \mu\text{m}$.
7. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es einen Porendurchmesser d von $0.5 \leq d \leq 100 \text{ nm}$, bevorzugt von $1 \leq d \leq 50 \text{ nm}$, besonders bevorzugt von $2 \leq d \leq 6 \text{ nm}$.
8. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es aus einem hydroxylgruppenhaltigen organischen organischen Polymer oder Copolymer besteht.
9. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass es aus silikathaltigem Material besteht, auf seiner äußeren Oberfläche mit Polyethylenglycol oder Polyoxyethylen modifiziert ist und die Porenoberfläche mit hydrophoben Gruppen insbesondere Phenylgruppen, C18, C8 und/oder Nitril modifiziert ist.
10. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass es aus hydroxylhaltigem Material besteht, auf seiner äußeren Oberfläche durch Glycin modifiziert ist und auf der Porenoberfläche durch Polypeptide insbesondere Tripeptide modifiziert ist.

11. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass es aus mit Glycerinpropyl modifiziertem Kieselgel besteht.
12. Verwendung von Trägermaterial nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass es aus mit Glycerinpropyl modifiziertem Glas besteht.
13. CEC-Vorrichtung mit folgenden Komponenten
 - Trägermaterialaufnahmeeinheit mit mindestens einem Einlaß und mindestens einem Auslass, gepackt mit Trägermaterial, welches porös ausgestaltet ist und dessen Oberfläche sich aus einer äußeren und einer Porenoberfläche zusammensetzt, wobei die äußere Oberfläche von der Porenoberfläche unterscheidbare Bereiche unterschiedlicher Derivatisierung und/oder Funktionalität aufweist,
 - mindestens zwei Gefäßen zur Aufnahme mobiler Phase, und
 - mindestens einer Spannungsquelle.
14. CEC-Vorrichtung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass eine Druckerzeugungseinrichtung zur Beaufschlagung der Trägermaterialaufnahmeeinheit mit Druck vorgesehen ist.
15. CEC-Vorrichtung nach Anspruch 13 und/oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass ein System zum automatisierten Wechseln der Gefäße zur Aufnahme der mobilen Phase vorgesehen ist.

16. CEC-Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägermaterialaufnahmeeinheit an mindestens einen Detektor gekoppelt ist.
17. CEC-Vorrichtung nach Anspruch 16 dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor als Massenspektrometer und/oder optischer Detektor insbesondere Lichtstreuendetektor, UV-Detektor und/oder elektrochemischer Detektor und/oder Fluoreszenzdetektor und/oder Leitfähigkeitsdetektor und/oder Refractive Index Detektor, insbesondere Laser-based Refractive Index Detektor gekoppelt mit Absorptionsdetektion und/oder Laser-based Refractive Index Detektor using Backscatter und/oder Chemiluminescence Nitrogen specific Detector und/oder Thermooptischer Detektor, insbesondere Thermooptischer Absorptionsdetektor und/oder Laser Induced Capillary Vibrationsdetektor ausgebildet ist.
18. CEC-Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor ein Condensation Nucleation Light Scattering Detektor ist.
19. CEC-Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägermaterialaufnahmeeinheit eine Kapillarsäule ist.
20. CEC-Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Trägermaterialaufnahmeeinheit als Teil eines Kanalsystems auf einem Chip ausgebildet ist.
21. CEC-Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillarsäule und der Chip aus

Kunststoff und/oder Glas und/oder Fused Silica und/oder Keramik und/oder Elastomer und/oder Polymeren bestehen.

22. CC-Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei Trägermaterialaufnahmeeinheiten vorgesehen sind, die miteinander über ein Kapillarsystem und/oder ein Kanalsystem verbunden sind.
23. CEC-Vorrichtung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass das Kanalsystem und/oder Kapillarsystem mindestens einen Auslass aufweist.
24. CEC-Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass der Auslass der Trägermaterialaufnahmeeinheit einen vom Einlaß abweichenden Innen- und/oder Außendurchmesser aufweist.
25. CEC-Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 16 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass der Auslass als Elektrospray-Einrichtung ausgebildet ist.
26. CEC-Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 16 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass eine Vielzahl, insbesondere 2 bis 50, besonders bevorzugt 2 bis 16 Trägermaterialaufnahmeeinheiten parallel und/oder zweidimensional angeordnet sind.
27. CEC-Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 16 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass die mindestens eine Trägermaterialaufnahmeeinheit eine Mischung verschiedener Sorten Trägermaterialien enthält, wobei jede Sorte Trägermaterial porös ausgestaltet ist und seine Oberfläche sich aus einer äußeren und einer Poren-

oberfläche zusammensetzt, wobei die äußere Oberfläche von der Porenoberfläche unterscheidbare Bereiche unterschiedlicher Derivatisierung und/oder Funktionalität aufweist.

28. CEC-Säule mit mindestens einem Einlaß und mindestens einem Auslass, gepackt mit Trägermaterial, welches porös ausgestaltet ist und dessen Oberfläche sich aus einer äußeren und einer Porenoberfläche zusammensetzt, wobei die äußere Oberfläche von der Porenoberfläche unterscheidbare Bereiche unterschiedlicher Derivatisierung und/oder Funktionalität aufweist,
29. CEC-Verfahren zur Probenaufbereitung mit folgenden Schritten:
- Aufbringen einer Probe, bestehend aus Analyt und Probenmatrix, auf eine CEC-Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 28,
 - Anlegen einer elektrischen Spannung zur Erzeugung eines elektroosmotischen Flusses,
 - Aufbringen eines Waschpuffers,
 - Elution der Probenmatrix,
 - Aufbringen eines Transferpuffers,
 - Elution des Analyten.
30. CEC-Verfahren zur kombinierten Probenaufbereitung und Trennung mit folgenden Schritten:
- Aufbringen einer Probe, bestehend aus Analyt und Probenmatrix, auf eine CEC-Vorrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 13 bis 28,
 - Anlegen einer elektrischen Spannung zur Erzeugung eines elek-

troosmotischen Flusses,

- Aufbringen eines Waschpuffers,
- Elution der Probenmatrix,
- Aufbringen eines Elutionspuffers,
- Auftrennung und Elution des Analyten.

31. CEC-Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, dass nach der Auftrennung des Analyten seine Bestandteile und/oder die Konzentration der Bestandteile durch einen Detektor bestimmt werden.
32. CEC-Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor ein Massenspektrometer und/oder optischer Detektor insbesondere Lichtstreuendetektor, Condensation Nucleation Light Scattering Detektor und/oder elektrochemischer Detektor und/oder Leitfähigkeitsdetektor und/oder Refractive Index Detektor, insbesondere Laser-based Refractive Index Detektor gekoppelt mit Absorptionsdetektion und/oder Laser-based Refractive Index Detektor using Backscatter und/oder Chemiluminescence Nitrogen specific Detector und/oder Thermooptischer Detektor, insbesondere Thermooptischer Absorptionsdetektor und/oder Laser Induced Capillary Vibrationsdetektor ist.
33. CEC-Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 29 bis 32, dadurch gekennzeichnet, dass das Aufbringen der Probe auf die CEC-Vorrichtung hydrodynamisch und/oder elektroosmotisch und/oder elektrophoretisch durchgeführt wird.
34. CEC-Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 29 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestandteile des Analyten nach

der Auftrennung fraktioniert gesammelt werden.

35. CEC-Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass der Analyt nach der Elution auf eine Trennungsvorrichtung insbesondere High Pressure Liquid Chromatographie Vorrichtung, Kapillarelektrophorese-Vorrichtung oder Flüssigkeitschromatographie-Vorrichtung überführt wird.
36. CEC-Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 29 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass der Analyt nach der Trennung in seine Bestandteile beim Austritt aus der Trägermaterialaufnahmeeinheit durch eine Elektrosprayeinrichtung zerstäubt wird.

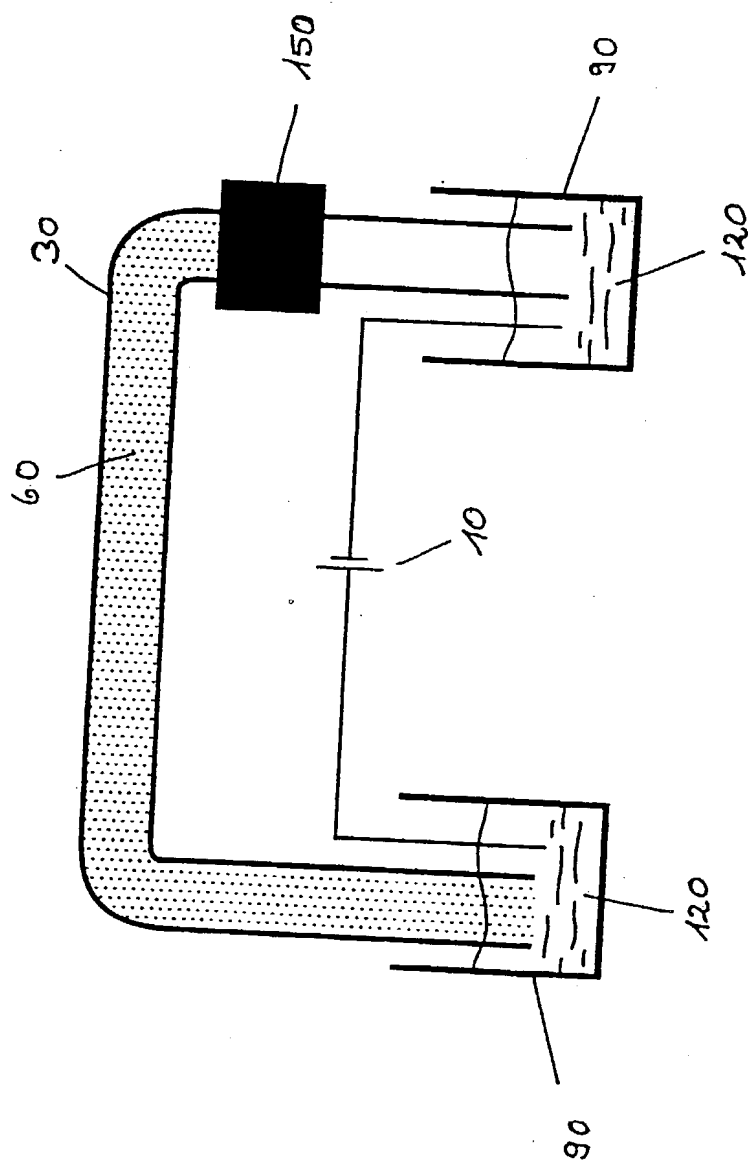


Abbildung 1

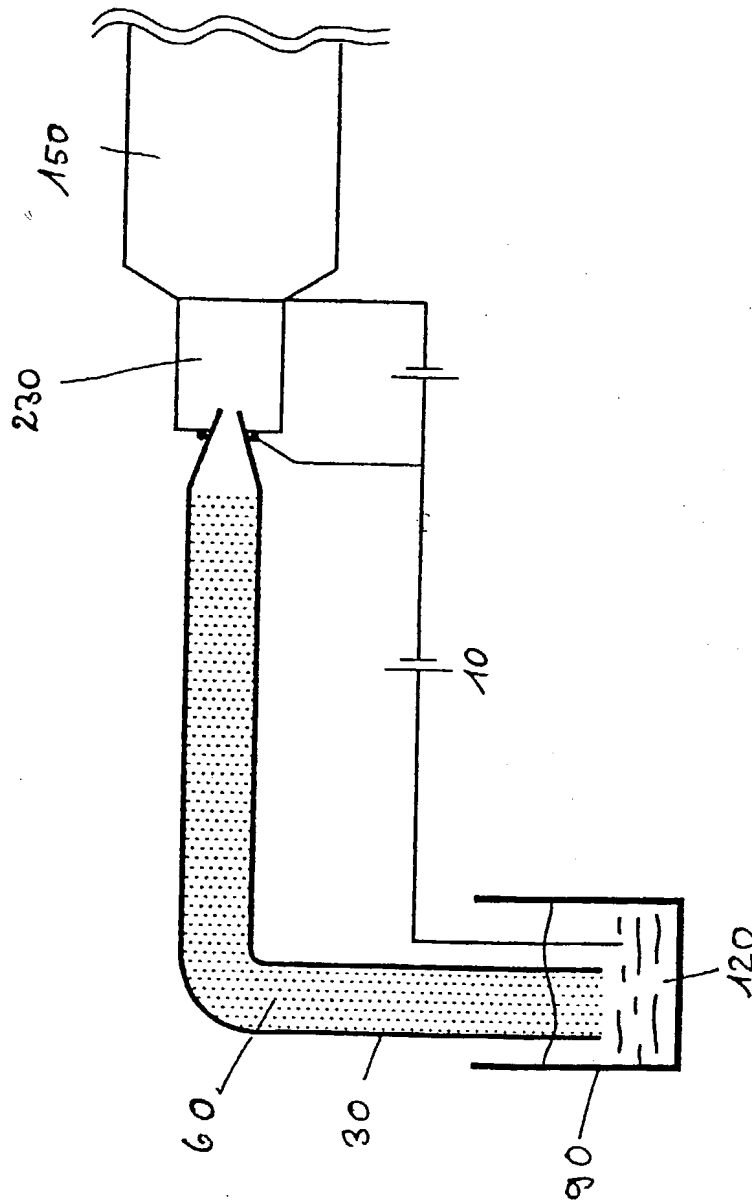


Abbildung 2

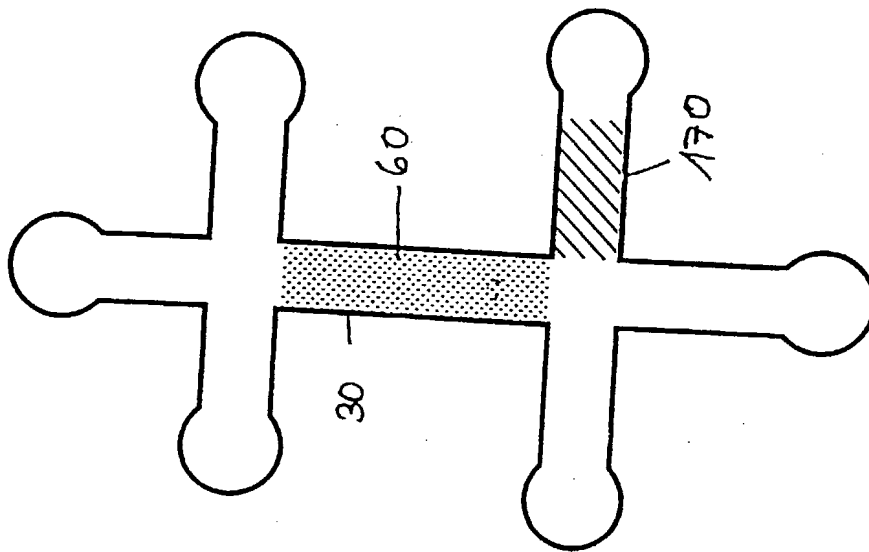


Abbildung 3

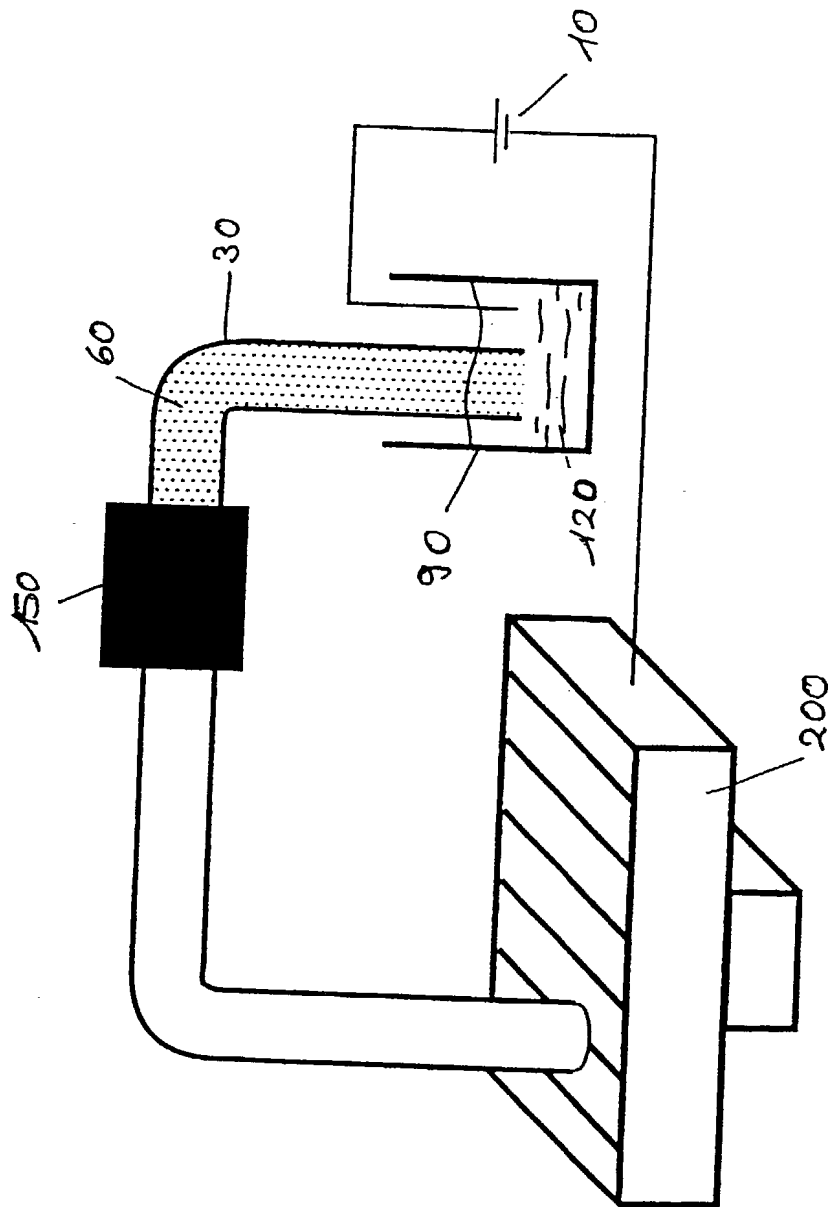


Abbildung 4

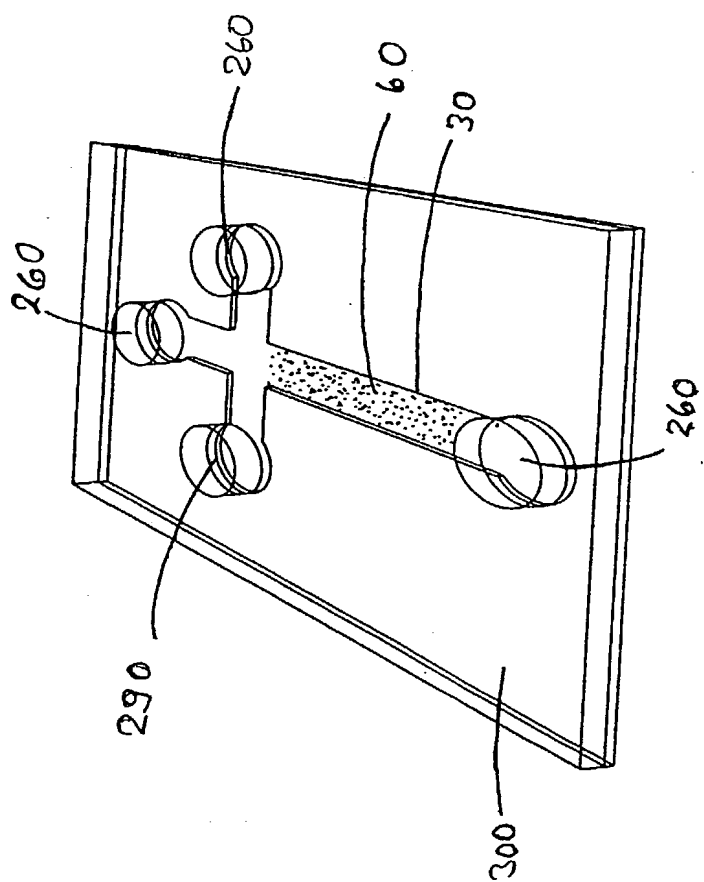


Abbildung 5

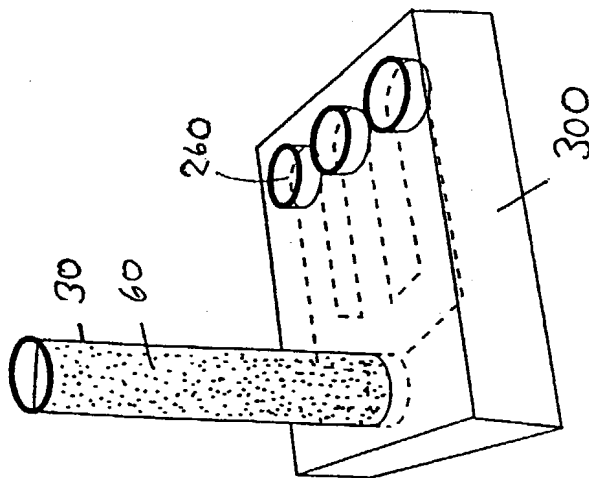


Abbildung 6

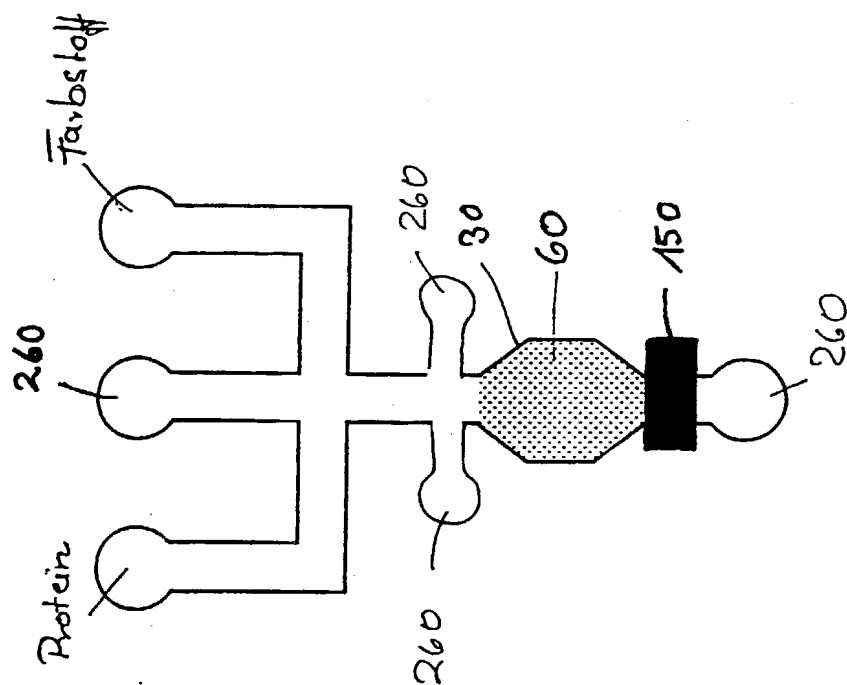


Abbildung 7

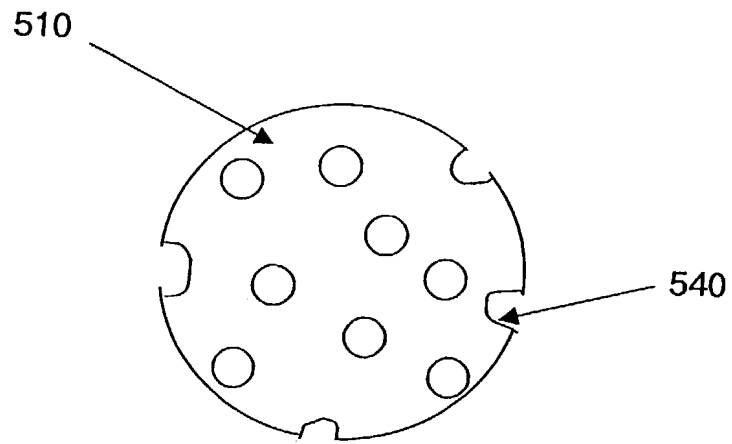
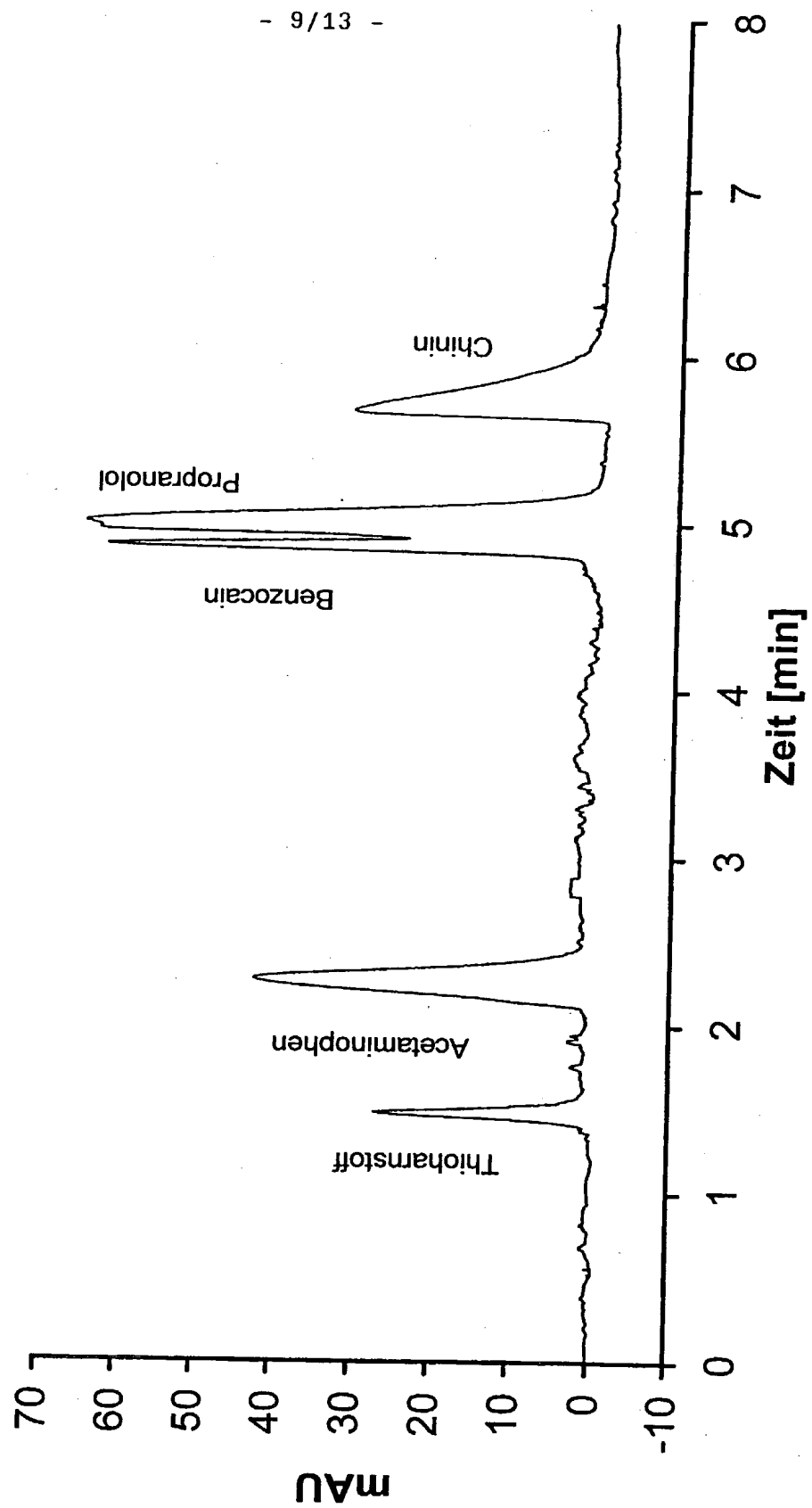


Abbildung 8

Abbildung 9



- 10/13 -

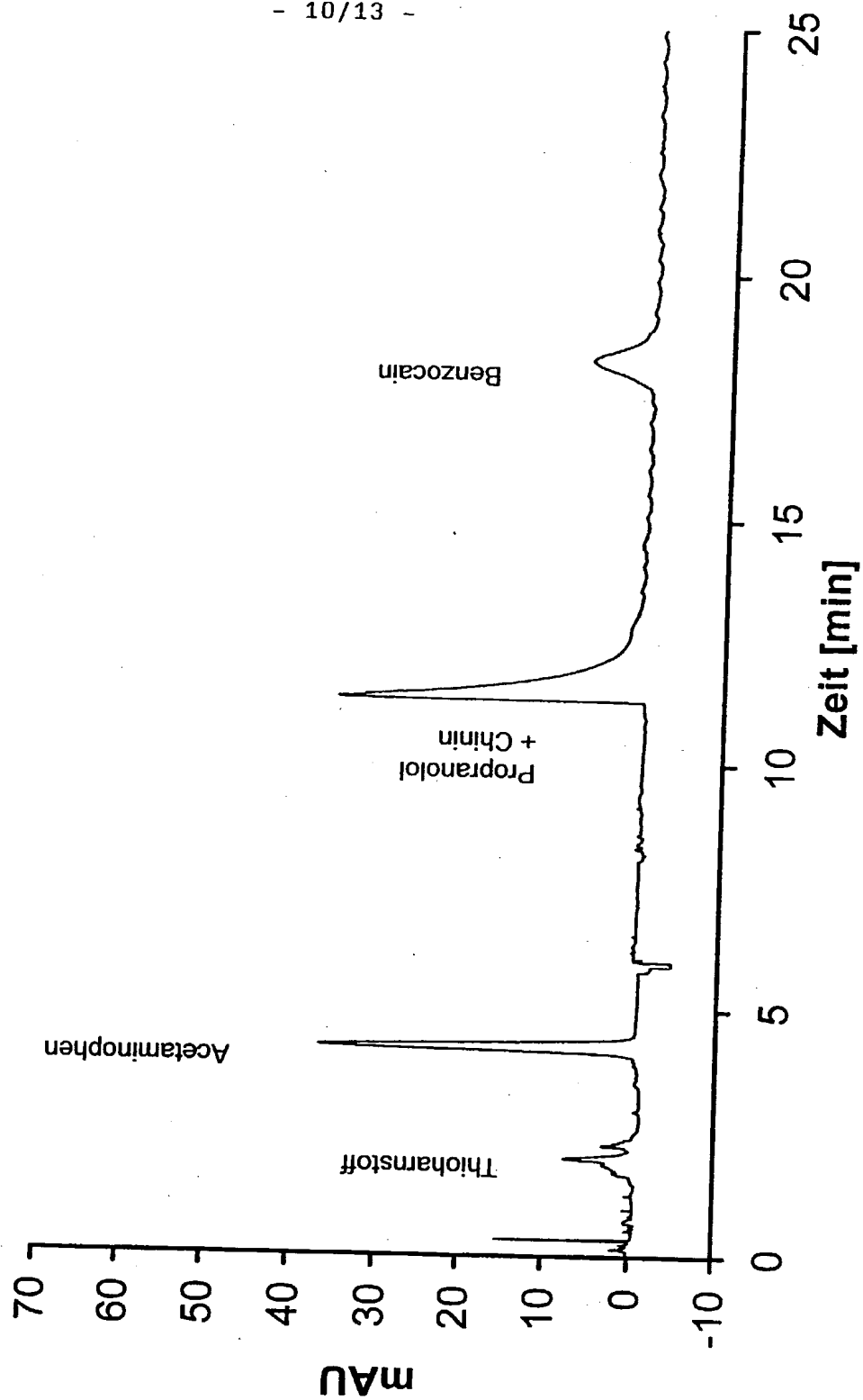


Abbildung 10

Abbildung 11

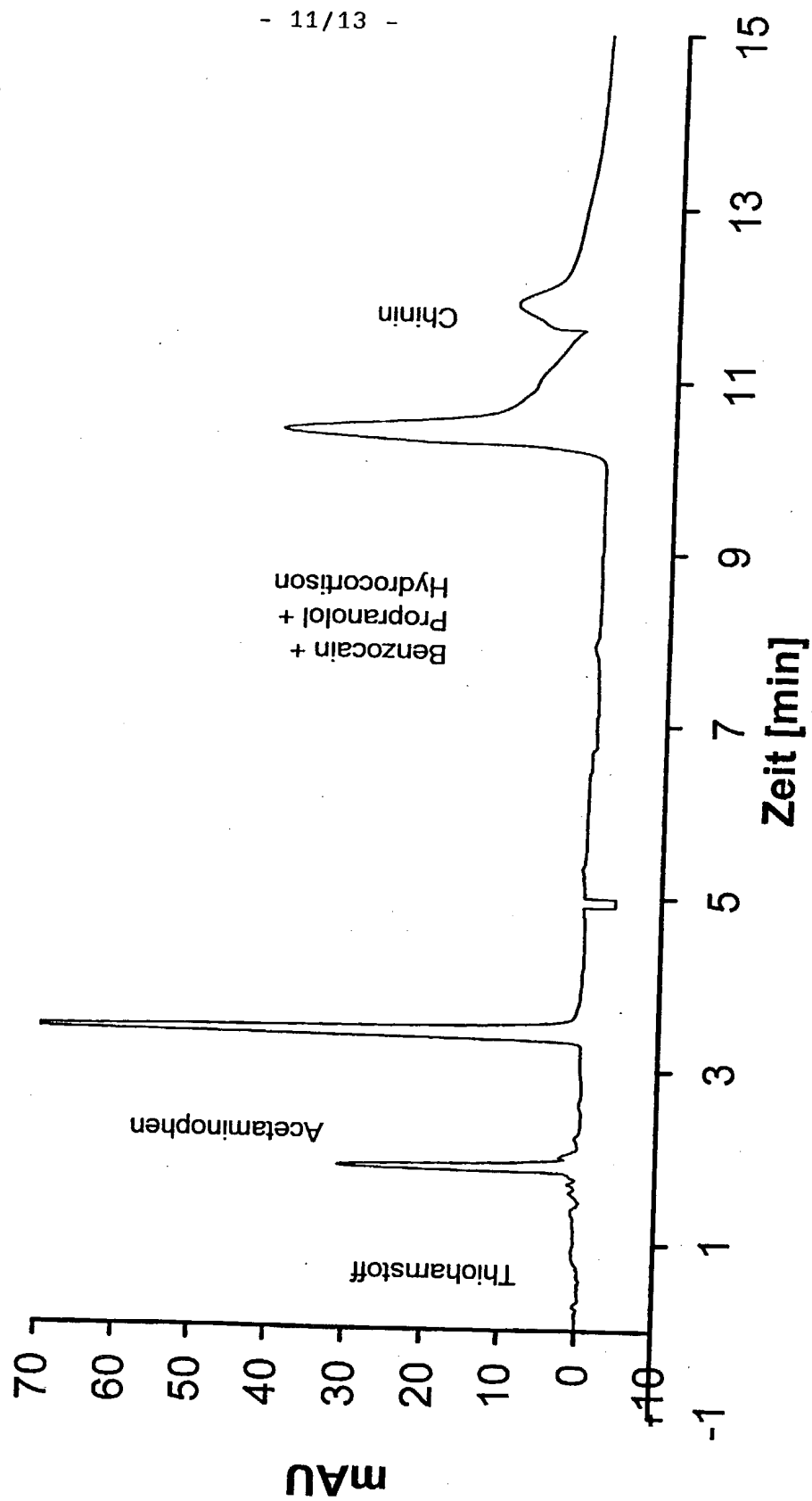
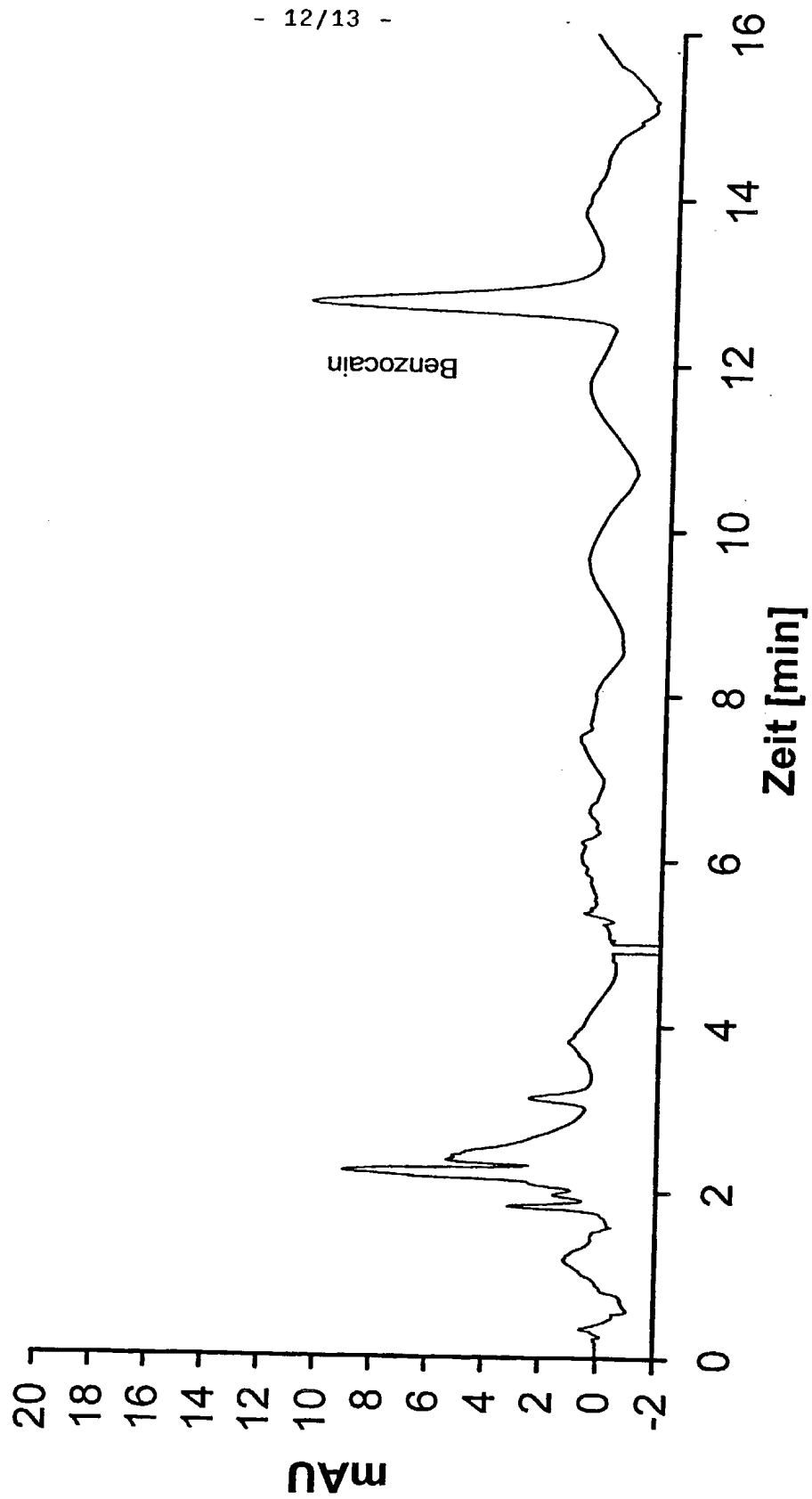
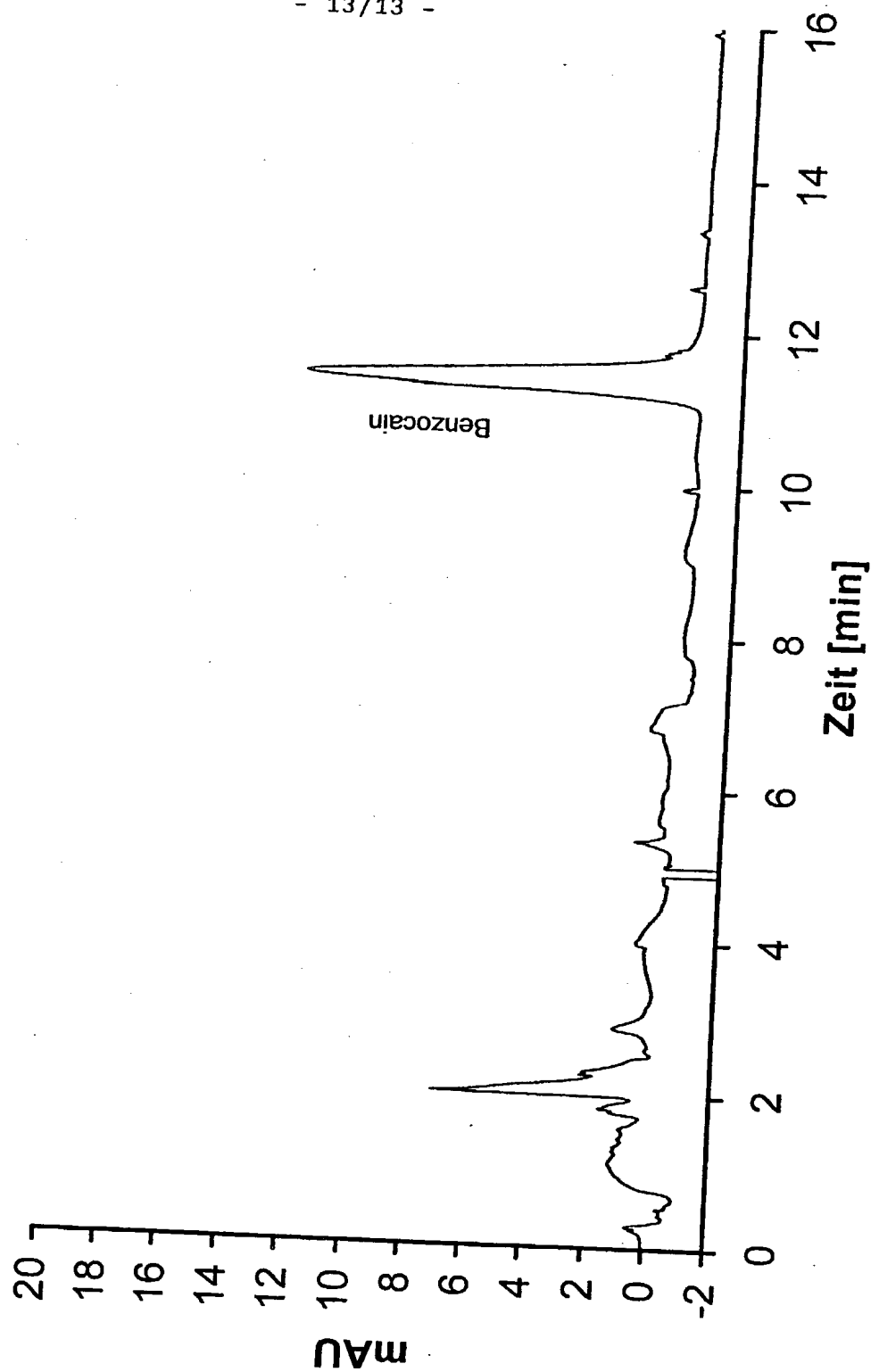


Abbildung 12



- 13/13 -

Abbildung 13



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/01393

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N30/48 G01N30/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 869 152 A (COLON LUIS A) 9 February 1999 (1999-02-09) the whole document	1-36
A	NARANG P ET AL: "Sol-gel-derived fluorinated stationary phase for open tubular electrochromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, NL, ELSEVIER SCIENCE, vol. 773, no. 1-2, 27 June 1997 (1997-06-27), pages 65-72, XP004125493 ISSN: 0021-9673 the whole document	1-36
A	WO 98 27418 A (DIONEX CORP) 25 June 1998 (1998-06-25) the whole document	1-36

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 June 2000

Date of mailing of the international search report

16/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/01393

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 813 062 A (BIO RAD LABORATORIES) 17 December 1997 (1997-12-17) column 1, line 21-24	1
A	WO 97 17606 A (NAT INST OF STANDARDS & TECHNO ; COLE KENNETH D (US); CABEZAS HERIB) 15 May 1997 (1997-05-15) the whole document	13, 29, 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/01393

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5869152	A	09-02-1999	NONE	
WO 9827418	A	25-06-1998	US 5792331 A	11-08-1998
			AU 7739498 A	15-07-1998
			EP 0948742 A	13-10-1999
EP 0813062	A	17-12-1997	US 5647979 A	15-07-1997
			AU 702340 B	18-02-1999
			AU 2476697 A	18-12-1997
			DE 813062 T	13-08-1998
			JP 2854295 B	03-02-1999
			JP 10067811 A	10-03-1998
WO 9717606	A	15-05-1997	US 5611904 A	18-03-1997
			AU 7669996 A	29-05-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01393

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N30/48 G01N30/28

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 869 152 A (COLON LUIS A) 9. Februar 1999 (1999-02-09) das ganze Dokument	1-36
A	NARANG P ET AL: "Sol-gel-derived fluorinated stationary phase for open tubular electrochromatography" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A,NL,ELSEVIER SCIENCE, Bd. 773, Nr. 1-2, 27. Juni 1997 (1997-06-27), Seiten 65-72, XP004125493 ISSN: 0021-9673 das ganze Dokument	1-36
A	WO 98 27418 A (DIONEX CORP) 25. Juni 1998 (1998-06-25) das ganze Dokument	1-36

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Juni 2000

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

16/06/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter ~~nales~~ Aktenzeichen

PCT/EP 00/01393

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 813 062 A (BIO RAD LABORATORIES) 17. Dezember 1997 (1997-12-17) Spalte 1, Zeile 21-24	1
A	WO 97 17606 A (NAT INST OF STANDARDS & TECHNO ; COLE KENNETH D (US); CABEZAS HERIB) 15. Mai 1997 (1997-05-15) das ganze Dokument	13, 29, 30

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01393

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5869152 A	09-02-1999	KEINE	
WO 9827418 A	25-06-1998	US 5792331 A	11-08-1998
		AU 7739498 A	15-07-1998
		EP 0948742 A	13-10-1999
EP 0813062 A	17-12-1997	US 5647979 A	15-07-1997
		AU 702340 B	18-02-1999
		AU 2476697 A	18-12-1997
		DE 813062 T	13-08-1998
		JP 2854295 B	03-02-1999
		JP 10067811 A	10-03-1998
WO 9717606 A	15-05-1997	US 5611904 A	18-03-1997
		AU 7669996 A	29-05-1997